

Diabetische Neuropathie im Tiermodell

**Elektrophysiologische und morphologische
Untersuchungen
unter Therapie mit einem neuen
Aldosereduktasehemmer**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Karsten Riege
aus Neuenrade

Gießen, 2004

Aus der Klinik und Poliklinik III
Zentrum für Innere Medizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Reinhard Bretzel)
der Universitätsklinik Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Stracke

Gutachter: PD Dr. med. Kuchelmeister

Tag der Disputation: 07.12.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielstellung
 - 1.1 Einleitung
 - 1.1.1 Theorien zur diabetischen Neuropathie
 - 1.1.2 Aldosereduktase als Enzym
 - 1.1.3 Pharmakologie des Aldosereduktasehemmers
CP-73-850
 - 1.2 Zielstellung der vorliegenden Arbeit
2. Material und Methodik
 - 2.1 Material
 - 2.2 Methodik
 - 2.2.1 Experimentalgruppen
 - 2.2.2 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit
 - 2.2.3 Anlagen der Messelektroden
 - 2.2.4 Morphologie
 - 2.2.5 Statistische Auswertung
3. Ergebnisse
 - 3.1 Allgemeine Vorbemerkungen zum Ergebnisteil
 - 3.2 Ergebnisse aus der Messung der
Nervenleitgeschwindigkeit
 - 3.2.1 Experiment A
 - 3.2.2 Experiment B
4. Diskussion
 - 4.1 Experiment A
 - 4.2 Experiment B
 - 4.3 Kritische Gesamtwertung der Ergebnisse

5. Zusammenfassung
6. Literaturverzeichnis

7. Anhang
8. Lebenslauf
9. Danksagung
10. Eidesstattliche Erklärung

Diabetische Neuropathie im Tiermodell

Elektrophysiologische und morphologische Untersuchungen unter Therapie mit einem neuen Aldosereduktasehemmer

1. Einleitung und Zielstellung

1.1 Einleitung

1.1.1 Theorien zur diabetischen Neuropathie

In den letzten Jahren wurde durch eine zunehmende Verbesserung der Diabetes-Therapie mit modernen Insulin-Formen sowie dem Basis-Bolus-Prinzip in der Insulin-Therapie weitreichende Fortschritte erzielt. Damit treten zugleich immer mehr die ‚sekundären‘ Komplikationen des Diabetes mellitus in den Vordergrund.

Hierzu zählen die Mikroangiopathie (diabetische Retinopathie und Nephropathie), die Makroangiopathie (Koronarsklerose, erhöhtes Herzinfarkt-Risiko und periphere Durchblutungsstörungen) und die diabetische Neuropathie.

Es ist zwischenzeitlich allgemein anerkannt, dass eine permanente hyperglykämische Stoffwechsellage auslösender Faktor für die diabetische Polyneuropathie ist. Die Prävalenz schwankt allerdings nach neueren Angaben zwischen 10 und 50 % (Boulton et al., 1985, Thomas u. Eliasson, 1950) bzw. zwischen 10 und 90% (Vinik et al. 1999, 2000).

Weiterhin gilt es als gesichert, dass Inzidenz und Schweregrad nach Alter des Patienten, Dauer des Diabetes und der Möglichkeit der exakten Kontrolle des Blutzuckers variieren (Masson u. Boulton, 1990).

Es ist auch bekannt, dass diabetische Patienten schwerste Nervenschädigungen haben können, ohne dabei Symptome einer Polyneuropathie aufzuweisen. Andererseits gibt es Patienten mit schwersten schmerzbestimmten Symptomen sowie auch autonome Nervenschädigungen ohne elektrophysiologisch nachzuweisende Veränderungen am Nerven (Archer et al., 1983).

Die diabetische Polyneuropathie sowie die Mikro- und Makroangiopathie stellen die Hauptkomplikationen des Diabetes mellitus dar (Perkins et al., 2003, Poncelet, 2003, Vinik et al., 1999, 2000, Yasuda et al., 2003).

Die periphere Neuropathie wird in zwei Hauptkategorien eingeteilt (Assalt u. Lingier, 1986) : Einerseits gibt es die symmetrische Polyneuropathie, andererseits die fokalen und multifokalen Neuropathien.

Klassifikation der diabetischen Neuropathien nach (Brown, Greene, 1984)

1. Distal symmetrische Polyneuropathie
 - gemischte sensorisch-motorisch-autonome Neuropathie
 - überwiegend sensorische Neuropathie
 - überwiegend motorische Neuropathie
 - überwiegend autonome Neuropathie
2. Proximal asymmetrische Neuropathie

3. Fokale und multifokale Neuropathie
 - asymmetrisch proximale motorische Neuropathie
 - kraniale Neuropathie
 - interkostale und andere Mononeuropathien

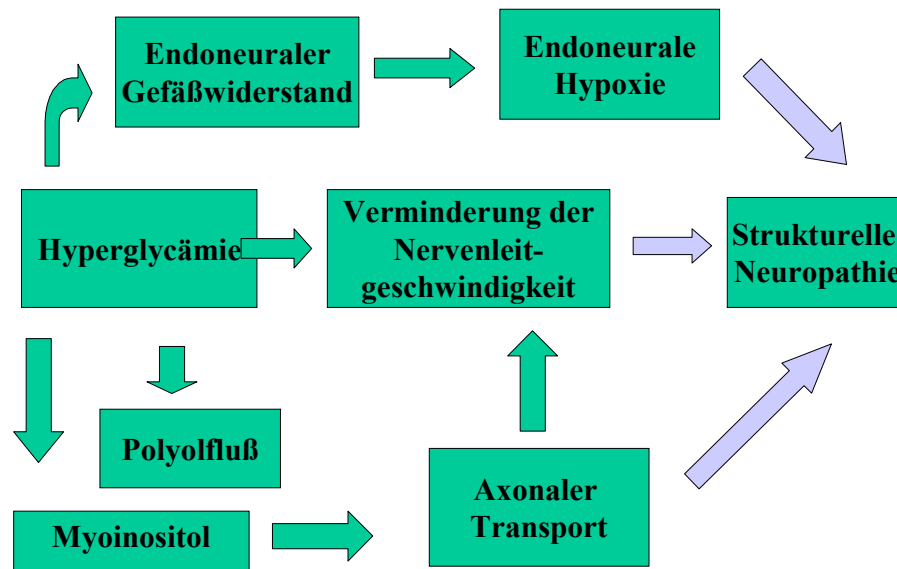
Histologisch gesehen kommt es bei der diabetischen Polyneuropathie zu folgenden Veränderungen:

1. Segmentale Demyelisation
2. Verringerung der Schwann'schen Zellen
3. Schrumpfungsprozesse des Axons
4. Degeneration am Axon selber (Cohen 1988).

Auch hierbei gilt, dass schwere Symptome auftreten können, ohne dass sich dafür ein histologisches Korrelat findet und umgekehrt. Diese schweren histologischen Veränderungen sind zum Teil auf die Hyperglykämie selbst mit ihren osmotischen Veränderungen, aber auch auf die von der Hyperglykämie ausgelösten biochemischen Veränderungen zurückzuführen.

Im Laufe der letzten Jahre sind eine Reihe von Theorien entstanden, die versuchen, diese biochemischen Veränderungen mit den daraus folgenden elektrophysiologischen Schäden zu erklären. Dabei zeigte sich, dass verschiedene Mechanismen miteinander in Verbindung stehen und sich teilweise gegenseitig bedingen.

Aufgrund vorliegender Forschungsergebnisse entwickelten Masson und Boulton (1990) folgendes Modell:



Ätiologische Faktoren (Masson, Boulton, 1990)

Abb. 1: Pathogenese der diabetischen Neuropathie.

Die Abbildung 1 zeigt ätiologische Faktoren, die in die Pathogenese der diabetischen Neuropathie eingebunden sind, dabei repräsentieren grüne Pfeile experimentell gesicherte Verbindungen, während blaue Pfeile vermutete Interaktionen darstellen.

Auf die einzelnen Faktoren, die in diesem Bild dargestellt werden, wird im Folgenden noch näher eingegangen.

Anhand von histologischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass es unter einer andauernden Hyperglykämie zu einer Verdickung der Zellmembranen der Perineuralzellen, zur Hyperplasie des Endothels und zur Thrombozytenaggregation in den Kapillaren selber kommt. Diese Veränderungen haben einen großen Anteil an der Entstehung der diabetischen Polyneuropathie. Allerdings bestehen zur Zeit noch Zweifel, ob diese Veränderungen nicht auch Folge des primären pathogenetischen Prozesses sind, der hauptverantwortlich für die diabetische Polyneuropathie ist.

Der Nerv selber gehört zu den Geweben des menschlichen Körpers, welche zum Transport von Glukose kein Insulin benötigen. Daher gibt die Glukosekonzentration des Axons und der Schwann'schen Zellen die Konzentration des extrazellulären Raumes wieder. In den Schwann'schen Zellen ist das Enzym Aldosereduktase lokalisiert. Dieses Enzym ist das Schlüsselenzym des Polyol-Stoffwechsels. Unter normalen Umständen ist die Affinität der Aldosereduktase für Glukose eher gering. Besteht allerdings ein vermehrtes Angebot an Glukose, kommt es zur erheblichen Aktivitätssteigerung dieses Enzyms und damit auch zu einem erheblich höheren Umsatz der Ausgangsprodukte über den Polyol-Stoffwechsel zu den Metaboliten Sorbitol und Fruktose.

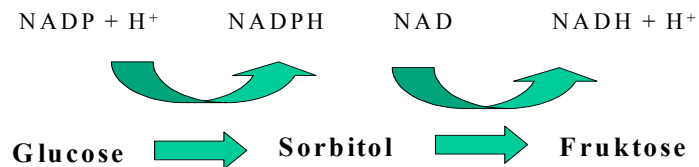


Abb. 2 Polyol-Stoffwechsel-Weg
(nach Cohen 1988).

Durch den sehr stark induzierten Polyol-Stoffwechsel kommt es zu einem sehr hohen Konzentrationsanstieg von Sorbitol in den Schwann'schen Zellen. Die klassische Erklärung der Pathogenese der diabetischen Polyneuropathie war, dass starke osmotische Effekte, hervorgerufen durch die hohe Konzentration von Sorbitol, zur Schädigung der Zellen und nachfolgend zum Auflösen der Zellen führen würden.

Dies könnte auch die fortgeschrittene Demyelinisierung des Nervs erklären, da die Schwann'schen Zellen eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung des Myelin-Stoffwechsels spielen (Cohen 1988).

Diese Theorie ließ sich durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nie sicher nachweisen.

Weiterhin gab es Überlegungen, in denen die Hyperosmolarität bei der diabetischen Stoffwechsellage verantwortlich gemacht wird für

die Schrumpfung des Axons selber (Cameron et al. 1986, 1989, Schmidt, 2001, Sima et al., 1988, 1991, 1993).

Diese Überlegungen lassen den Schluss zu, dass primär eine Schädigung des Axons mehr noch als eine Demyelisation die Hauptursache für die diabetische Polyneuropathie ist. Allerdings gilt es zu bedenken, dass die Sorbitolkonzentration, die am Nerv akkumuliert, so gering ist, dass ein osmotischer Effekt eher unwahrscheinlich scheint.

Ein anderer Weg, in dem der gestörte Polyol-Stoffwechsel eine Änderung des Metabolismus des Axons verursacht, ist der Einfluss auf den Myoinositol-Stoffwechsel und auf den Phosphoinositol-Stoffwechsel sowie die Regulation der Natrium/Kalium-ATPase (Na/K-ATPase) (Berti-Mattera et al., 1996, Coppey et al., 2002, Gupta et al., 2002, Obrasova et al. 2002). Immer häufiger werden auch Beziehungen zum antioxidativen System und zur Superoxid-Dismutase in die Untersuchungen einbezogen (Gupta et al., 2002, Obrasova et al. 2002).

Myoinositol ist ein ubiquitär vorkommender Zellbestandteil, der offensichtlich eine wichtige Rolle in der Funktion des Nervs spielt.

In tierexperimentell-therapeutischen Studien hat sich gezeigt, dass es in den peripheren Nerven diabetischer Ratten zu einem signifikanten Abfall des Myoinositol-Gehaltes kommt. Weiterhin zeigte sich auch eine Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit, die durch orale Zufuhr von Myoinositol gebessert werden konnte trotz weiterbestehender Hyperglykämie.

Um einen Zusammenhang zu finden zwischen dem veränderten Polyol-Stoffwechsels, dem Myoinositolgehalt des Nervs und der Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit wurden verschiedene Mechanismen diskutiert.

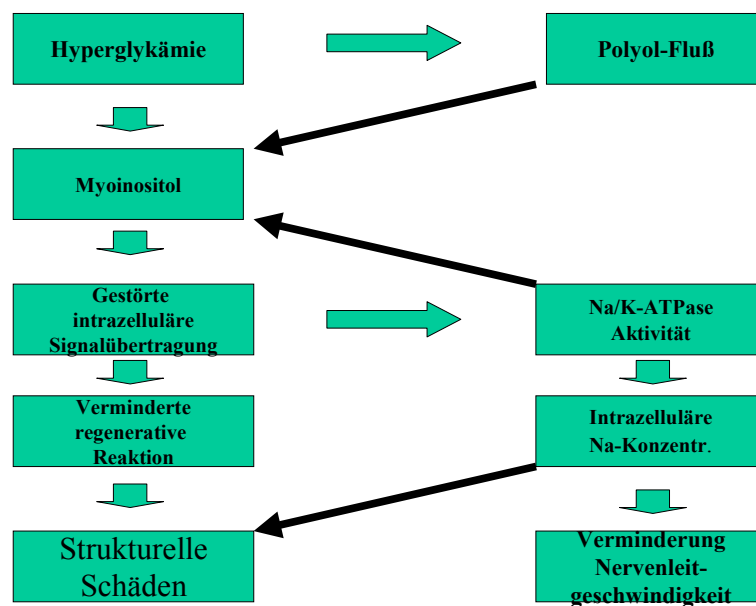


Abb. 3

Vereinfachte Zusammenfassung der ‚Myoinositolhypothese‘ in der Ätiologie der diabetischen Neuropathie (nach Greene et. Al. 1988)

Man hat bei in-vitro-Studien nachgewiesen, dass die Myoinositol-Aufnahme des Nervs durch ein natriumabhängiges Transportsystem erfolgt. Eine mögliche Schlussfolgerung war, dass dieses Transportsystem direkt durch die Hyperglykämie gehemmt wird. Dagegen spricht jedoch, dass durch die Therapie mit einem Aldosereduktasehemmer der Myoinositolgehalt des

Nervs gebessert wird, ohne dass die Hyperglykämie beeinflusst wird.

Eine mögliche Erklärung ist, dass der erhöhte Gehalt von Stoffwechselprodukten des Polyol-Stoffwechsels des Nervs zu einem vermehrten Verlust der Zelle von Myoinositol führt.

Dies hat man zum Beispiel in in-vitro-Versuchen mit Linsen von Versuchstieren, die in einem hyperglykämischen Medium lagen, nachgewiesen. Hierbei kam es zu einem stark erhöhten Myoinositol-Ausfluss (Tomlinson, 1992, 1993).

Nach Dvornik und Porte (1987) steht erhöhte Sorbitol-Akkumulation nicht nur in enger Beziehung zum Myoinositol-Stoffwechsel, sondern auch zur verminderten Natrium/Kalium-ATPase-Aktivität.

Dieses Enzym, welches in der Zellmembran lokalisiert ist, hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Natriumkonzentration im Nerv. Die Aktivität dieses Enzyms ist reduziert in peripheren Nerven von diabetischen Tieren. Dies hat zur Folge, dass es zu einer Akkumulation von Natrium während der Depolarisation kommt und sich daraus eine Störung in der Weiterleitung des Nervimpulses ergibt.

Eine orale Zufuhr von Myoinositol hat wiederum eine Besserung der Enzymaktivität bewirkt, ebenso wie die Therapie mit einem Aldosereduktasehemmer. Daraus kann man folgern, dass ein verringerter Myoinositolgehalt dieses Enzym schädigt, genauso wie eine erhöhte Sorbitolkonzentration. Die Natrium-Kalium-ATPase ist ebenfalls eng mit dem Phosphoinositol-Stoffwechsel verknüpft.

Phosphoinositol ist sowohl ein Baustein als auch ein Abfallprodukt der Polyphosphoinositide, welche in hoher Konzentration in den peripheren Nerven vorkommen, wo sie mit Myelin verbunden sind.

Der Phosphoinositol-Stoffwechsel kann durch einen verminderten Myoinositolgehalt gestört werden, woraus sich wiederum eine Schwächung der Natrium/Kalium-ATPase-Aktivität ergibt, welche, wie oben gezeigt, verantwortlich ist für eine gestörte Nervenleitung (Cohen 1988, Greene, 1988).

Aus den oben gemachten Feststellungen ergibt sich folgendes Schema, wie es Greene 1988 vorgeschlagen hat:

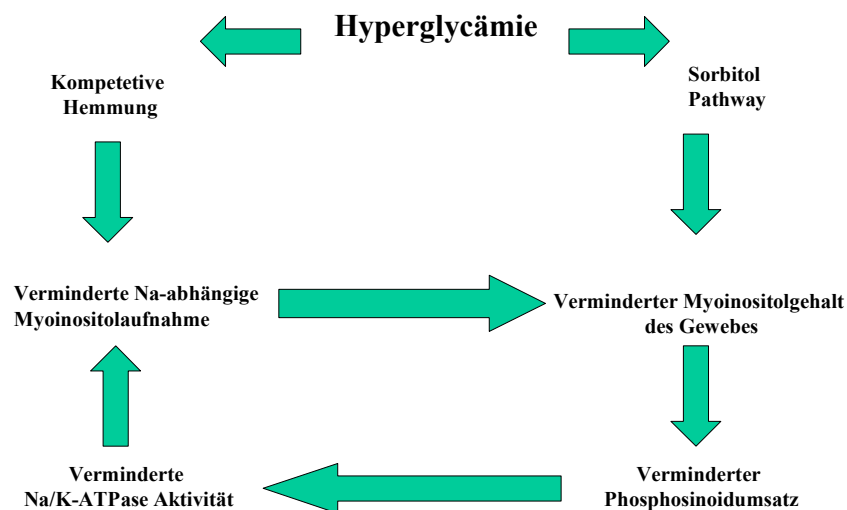


Abb. 4

(nach Green et. al., 1988)

Es bleibt allerdings festzustellen, dass die o.g. Veränderungen am peripheren Nerv noch nicht endgültig als entscheidend für die diabetische Neuropathie angesehen werden.

Verschiedene in-vitro-Studien zeigen aber einen erheblichen Rückgang in der Aktivität der oben beschriebenen Stoffwechselquellen.

Als weiteren Beweis für die Bedeutung eines gestörten Phosphoinositol-Stoffwechsels bewerten Greene et al. (1988) die Tatsache, dass durch Agonisten der Protein-Kinase C, einem vermeintlichen "Botenstoff", welcher durch den Phosphoinositol-Stoffwechsel reguliert wird, der reduzierte Sauerstoffverbrauch normalisiert wird, welcher normalerweise die verminderte Natrium/Kalium-ATPase-Aktivität im Nerven wiedergibt. Daraus wurde geschlossen, dass der Myoinositol-Verlust des Nerven zu gestörter Natrium/Kalium-ATPase-Aktivität führt und dafür ein Mechanismus mit Protein-Kinase C benutzt wird. Weiterhin wird schlussgefolgert, dass ein veränderter Phosphoinositid-Metabolismus vermutlich zu einem Verlust an Myoinositol führt, der wiederum einem Defekt im Protein- Kinase- C-System unterliegt.

Zusammenfassend ergeben sich nach Dvornik und Porte (1987) folgende hyperglykämieinduzierte Veränderungen beim tierexperimentellen Diabetes:

Art der Veränderungen

BIOCHEMISCH: Polyol-Akkumulation.

Myoinositol-Abfall

Na/Ka-ATPase-Aktivitätsverminderung
Endoneurale Na-Akkumulation

FUNKTIONELL: Verminderung der motorischen
Nervenleitgeschwindigkeit
Verminderung des axonalen Transports
Glomeruläre Filtration
Vaskuläre Permeabilität
Re-Epithelisierung der Cornea

STRUKTURELL: Katarakt
Basalmembran-Verdickung

Die oben beschriebene Hypothese, speziell die Sorbitol-, Myoinositol-, Natrium/Kalium-ATPase-Hypothese, lässt den Schluss zu, dass eine Unterbrechung dieses Kreislaufs durch Einsetzen eines Aldosereduktasehemmers zu einem nachweisbar klinischen Effekt führen kann, da eine Unterbrechung des Polyol-Stoffwechsels eine Akkumulation von Sorbitol und die dadurch verursachten negativen Auswirkungen verhindern würde.

Es hat in den vergangenen Jahren zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien gegeben, die teilweise als Langzeit- und auch als Kurzzeitstudien konzipiert waren. Dabei traten zum Beispiel in klinischen Versuchen mit den neuen Aldosereduktasehemmern Sorbinil und Alrestan teilweise erhebliche Nebenwirkungen auf, die einen weiteren Einsatz dieser Medikamente unmöglich machte.

Andere Aldosereduktasehemmer, wie zum Beispiel Fiderestat (Hotta, 2001), Epalrestat (Uchida, 1995), Tolrestat (Cotter et al. 1998, Macleod, 1992, Racciah et al. 1998), Zenarestat (Greene et al. 1999, Kihara et al. 2001), Zopolrestat (Hodgkinson et al. 2003, Inskeep et al. 1994, 1995, Schneider et al. 1998, Wilson et al. 1993) sind zur Zeit in Erprobung. Man erhofft sich hiervon vor allem eine erheblich verbesserte Verträglichkeit bei unveränderter Wirkung.

1.1.2 Aldosereduktase als Enzym

Um ein besseres Verständnis für den Einsatz eines Aldosereduktasehemmers zur Therapie der diabetischen Polyneuropathie zu bekommen, schließt sich nachfolgend eine nähere Betrachtung des Enzyms Aldosereduktase an.

Aldosereduktase gehört zu der Aldo-Keto-Reduktase-Enzymfamilie, die nur bei Säugetieren vorkommt. Es ist ein NADPH, das die Reduktion von Aldehyd zu den ihnen zugehörigen Alkoholen kanalisiert (Cohen 1988).

Aldosereduktase hat normalerweise eine sehr geringe Affinität zu seinem Substrat Glukose, so dass die Umsetzung im Polyol-Stoffwechsel nur langsam und in sehr geringem Maße abläuft. Bei einer ausgeprägten Hyperglykämie oder Galaktosämie (wie z.B. bei Versuchstieren, die mit galaktosereicher Nahrung gefüttert werden) kommt es zu einem starken Anstieg der Aktivität dieses Enzyms und damit zu einem starken Anstieg der Endprodukte Sorbitol sowie D-Fruktose.

In führenden Studien sind einige Verbindungen eingesetzt worden, die strukturell eine sehr inhomogene Gruppe darstellen, die allerdings als eine gewisse Fähigkeit zur Hemmung der Aldosereduktase besitzen. Der Hauptnachteil war, dass diese Stoffe in vivo Plasmamembranen nicht durchdringen konnten und dadurch für eine weitere Anwendung natürlich nicht in Frage kamen. Später wurden einige heterozyklische Stoffe gefunden, die in der Lage waren, das Enzym zu hemmen. Hierzu gehören zum Beispiel Alrestatin, Tolrestat, Sorbinil, Clinoril und Syntex, Quercitrin und Ponalrestat als Statil und UNU 2235, Fiderestat, Epalrestat, Zopolrestat, Zenarestat.

In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Aldosereduktase eine unübliche kinetische Charakteristik zeigt, die von der klassischen Michaelis-Menten-Kurve sehr stark abweicht. Diese und andere Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass es sich bei der Aldosereduktase um zwei Enzyme (Aldosereduktase I und Aldosereduktase II) handeln könnte. Weiterhin wurde vermutet, dass diese beiden Enzyme in unterschiedlichen Konzentrationen in den einzelnen Geweben des Säugetierkörpers vorkommt. Dies würde für die Zukunft die Möglichkeit eröffnen, Aldosereduktasehemmer lokal gezielt einzusetzen.

Klinische Studien haben gezeigt, dass die Aldosereduktasehemmer durch eine nicht kompetitive Hemmung wirken, also weder eine Substrat- noch eine Co-Faktor-Seite angreifen.

Hieraus und aus anderen strukturellen Einzelheiten, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, ist heute eine Art Grundgerüst erstellt worden, aus dem sich zukünftig wirksamere und besser verträgliche Aldosereduktasehemmer herleiten lassen könnten.

1.1.3 Pharmakologie des Aldosereduktasehemmers CP-73-850

Bei den bisher durchgeführten in-vitro- und in-vivo-Studien konnte nachgewiesen werden, dass der neue Aldosereduktasehemmer CP-73-850 ein potenter Hemmer der Umwandlung von Glukose zu Sorbitol ist. Dabei zeigte sich eine sehr ähnliche Aktivität zu dem bisher bekannten Aldosereduktasehemmer Statil.

Es wurden überwiegend Kurzzeit-Studien durchgeführt, die bis ca. 7 Tage andauerten. Als Hauptparameter zur Messung des Therapieerfolges fungierte die Messung der Sobitol-Konzentration am Ischiasnerv im Vergleich zu den Normaltieren. Auf die diabetische Stoffwechsellaage der Versuchstiere hatte die Therapie mit dem Aldosereduktasehemmer keinen Einfluss.

Im Vergleich zu den beiden Medikamenten Statil und Tolrestat, die ebenfalls in verschiedenen aufsteigenden Konzentrationen 2,5; 5; 10; 25 sowie 50 mg/kg Körpergewicht zugeführt worden waren, zeigte sich eine maximale Hemmung der Sorbitolkonzentration im Ischiasnerv der Versuchstiere bei einer Konzentration von 25 mg/kg Körpergewicht. Ähnlich war nur die Hemmwirkung von Statil bei gleicher Konzentration.

Die Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation lag beim Tierversuch bei annähernd 100 %. Die Plasmahalbwertszeit betrug bei den Versuchstieren (meistens Ratten) ca. 12 Stunden.

Bei den bisher durchgeführten und veröffentlichten Studien mit den bisher auf dem Markt befindlichen Aldosereduktasehemmern war ein Hauptproblem die Interpretation und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Studien untereinander. Es gibt sehr viele verschiedene Einflussgrößen sowie Messverfahren, so dass die Endresultate in erheblichem Maße verändert sein können.

Probleme zeigten sich vor allem bei klinischen Studien, wo schon allein die Frage der Patientenauswahl sich als sehr schwierig herausstellte. Einflussgrößen wie Alter des Patienten, Gewicht, Geschlecht, Diabeteseinstellung, Ernährung, Kontrolle des Blutzuckers, Stadium der diabetischen Polyneuropathie sowie Beginn der Behandlung spielen eine nicht unerhebliche Rolle.

Bei den Messtechniken sind die am häufigsten untersuchten Parameter die sensorische Reizschwelle, die sensorische Nervenleitgeschwindigkeit, die sensorische Empfindungsstörung, die Mikroangiopathie und eben die motorische Nervenleitgeschwindigkeit.

Die Messung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit ist eine der am häufigsten angewandten und am weitesten verbreiteten Messtechnik weltweit. Man kann sagen, dass sich hierbei schon eine gewisse Standardisierung eingestellt hat und dass die verschiedenen Messergebnisse der einzelnen Studien durchaus vergleichbar sind.

In einigen Langzeit-Studien zeigte sich auch, dass die Therapie mit einem Aldosereduktasehemmer durch Unterbrechung des Polyol-Stoffwechsels nicht nur zu einem Stop der pathologischen

Veränderungen am Nerv führt, sondern dass diese schon vorhandenen Veränderungen teilweise reversibel sein können (Green und Altena, 1987).

Es bleibt also die Möglichkeit bestehen, neben einer optimierten Blutglukoseeinstellung durch Einsatz eines potenten Aldosereduktasehemmers die biochemische Veränderung, ausgelöst durch die diabetische Stoffwechsellaage, zu verhindern und schon vorhandene Schädigungen wieder zu verringern.

In klinischen Versuchen zeigte sich, dass das für den Patienten am meisten belastende Symptom die ausgeprägte, vor allen Dingen periphere Schmerzempfindung ist, ausgelöst durch die diabetische Polyneuropathie. Der Schmerz kann im Einzelfall so stark ausgeprägt sein, dass nicht nur lokal, sondern auch systemisch stark wirksame Analgetika benutzt werden müssen. Danach folgen die weiteren, vor allem sensorischen Gefühlsstörungen, die Verminderung der Tiefensensibilität, vermindertes Temperaturempfinden sowie Verringerung der Vibrationsempfindung. All dies führt, zusammen mit der ebenfalls vorhandenen Mikroangiopathie, auch zu trophischen Veränderungen der Haut, die letztendlich im Einzelfall in ausgeprägten diabetischen Ulzerationen münden können.

Dazu kommen zudem die durch die oben beschriebenen Missempfindungen verursachten Fehlbelastungen, die zu Druckstellen durch beispielsweise schlechtes Schuhwerk führen können.

Weiterhin stellt durch das verringerte Temperaturempfinden der Umgang mit heißen Flüssigkeiten, wie z.B. Badewasser, ein großes Risiko für Verbrennungen oder Verbrühungen dar. Die

bisherige allgemein gültige Therapie beschränkte sich, wie oben schon erwähnt, auf die Gabe von ziemlich starken Analgetika sowie gelegentlich auch Lokalanästhetika. Einen gewissen positiven Effekt auf die periphere Schmerzempfindung hatte die Therapie mit einem thioctazidhaltigen Medikament. Dahingegen scheint die Therapie mit Vitamin-B-Komplexen nicht sicher wirksam zu sein.

Als ein neuer vielversprechender Therapieansatz erscheint zur Zeit die Anwendung von Mexiletin bei der Behandlung der schmerzhaften diabetischen Neuropathie. Hier zeigten sich im klinischen Versuch bei differenzierteren Beschwerden wie Stechen, Brennen oder Hitzemissempfindungen deutlich positive Effekte unter einer Therapie mit Mexiletin.

All diese oben erwähnten Therapieversuche der schmerzhaften diabetischen Neuropathie sollten aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass es sich hierbei nur um die Therapie der Symptome der ursächlichen Grunderkrankung der diabetischen Neuropathie handelt. Im Gegensatz dazu konzentriert sich die Therapie mit den Aldosereduktasehemmern auf die Verminderung bzw. Verbesserung der Schäden am Nerv selber.

Weiterhin muss noch einmal festgestellt werden, dass natürlich ursächlich eine exakte Einstellung der Stoffwechsellage das primäre Ziel jeder Diabetes-Therapie bzw. Therapie der diabetischen Neuropathie sein soll. Nur durch eine längerfristig konstante Stoffwechsellage unter Vermeidung jeglicher Hyperglykämie (sichtbar am normalen HbA1c-Wert) können auch

nach einem längeren Zeitraum die Veränderungen minimiert werden.

1.2 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Thema der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Therapie mit einem Aldosereduktasehemmer (CP 73-850) im Tiermodell.

Untersucht wurden die Auswirkungen auf die motorische Nervenleitgeschwindigkeit sowie morphologische Veränderungen. Die Effektivität der Therapie wurde durch Messung der Nervenleitgeschwindigkeit am motorischen Schwanznerven der Versuchstiere nachgewiesen. Die Beurteilung der morphologischen Veränderungen erfolgte durch mikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen.

Es wurden jeweils Gruppen von nicht-diabetischen Tieren, von diabetischen Tieren mit Insulin-Therapie, von diabetischen Tieren ohne Insulin-Therapie und von diabetischen Tieren mit Therapie durch Aldosereduktasehemmer gebildet.

Um einen Nachweis zur führen, ob auch nach einem diabetischen Zeitraum von ca. 2 bis 3 Monate, in denen die Tiere ohne jegliche Therapie blieben, eine Reversibilität der Neuropathie unter Therapie mit dem Aldosereduktasehemmer in Gang gesetzt werden konnte, wurde eine Gruppe von diabetischen Tieren erst nach einem solchen Zeitraum mit dem Medikament CP 73-850 behandelt.

MATERIAL UND METHODIK

2.1 Material

Es wurden weibliche Inzucht-Ratten (Typ Wistar) aus der Tierversuchsanstalt Hannover verwendet. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn ca. 3 Monate alt und durchschnittlich ca. 370 g schwer.

Bei den Tieren wurden durch eine intraperitoneale Injektion durch das Inselzellgift Streptozotocin in einer Konzentration von 50 mg/kg Körpergewicht eine künstliche diabetische Stoffwechsellage ausgelöst.

Die Messung des Blutglukosespiegels erfolgte mittels eines Reflocheck-II-Gerätes.

Es wurden insgesamt 8 Tiergruppen gebildet:

- Normalkontrolle I + II mit je 7 Tieren für 3 bzw. 6 Monate.
- Diabetische Kontrolle I mit 20 Tieren über einen Zeitraum von 6 Monaten.
- Diabetische Kontrolle II mit 15 Tieren über einen Zeitraum von 3 Monaten.
- Inhibitionsgruppe: Nach der Diabetes-Induktion wurden die Tiere (n = 12) sofort über einen Zeitraum von 3 Monaten mit Aldosereduktasehemmer behandelt.
 - Reversibilitäts-Studie: Nachdem die Tiere diabetisch gemacht wurden, begann die Therapie nach einem Zeitraum von ca. 2 bis 3 Monaten mit dem Aldosereduktasehemmer.

- Insulin-Therapie I: 15 diabetische Tiere, die über einen Zeitraum von ca. 6 Monaten täglich mit Insulin Depot H behandelt wurden.
- Insulin-Therapie II: 15 diabetische Tiere, die über einen Zeitraum von ca. 3 Monaten ebenfalls täglich mit Insulin Depot H behandelt wurden.

2.2 Methodik

2.2.1 Experimentalgruppen

Es wurden zwei verschiedene Experimentgruppen gebildet:

Experiment A umfasste einen Zeitraum von ca. 12 Wochen. Das Ziel dieses Experimentes war, es zu zeigen, dass die Therapie mit dem neuen Aldosereduktasehemmer (CP 73-850) dazu führt, dass mögliche diabetische Spätkomplikationen, wie z.B. die Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit, nicht oder nur in geringem Maße auftreten.

Zu Experiment A gehörten folgende Gruppen:

1. Normalkontrolle II: Nicht diabetische Kontrolltiere.
2. Diabetische Kontrolle II: Durch STZ-Injektion diabetisch gemachte Ratten ohne Insulin-Therapie.
3. Insulin-Therapie II: Durch STZ-Injektion diabetisch gemachter Ratten mit Insulin-Therapie.
4. Inhibitionsstudie: Durch STZ-Injektion

diabetisch gemachte Ratten mit sofortigem Beginn der Therapie durch einen Aldosereduktasehemmer mit gelegentlicher Gabe von Depot H Insulin.

Experiment B umfasste einen Zeitraum von 5 bis 6 Monaten. In diesem Experiment wurden den durch STZ diabetisch gemachten Ratten erst nach einem Zeitraum von ca. 12 Wochen das Medikament CP 73-850 gegeben.

Das Ziel dieses Experimentes war zu zeigen, ob der neue Aldosereduktasehemmer in der Lage ist, die durch die diabetische Stoffwechsellaage hervorgerufene Schädigung am peripheren motorischen Nerv, nachweisbar durch die verringerte Nervenleitgeschwindigkeit, wieder zu verbessern.

Zu Experiment B gehörten folgende Gruppen:

1. Normalkontrolle I: Nicht diabetische Ratten.
2. Diabetische Kontrolle I: Durch STZ-Injektion diabetisch gemachte Ratten ohne Insulin-Therapie.
3. Insulin-Therapie I: Durch STZ-Injektion diabetisch gemachte Ratten mit Insulin-Therapie.
4. Reversibilitätsstudie: Durch STZ-Injektion diabetisch gemachte Ratten, die nach einem Zeitraum von ca. 12 Wochen, wobei sie nur gelegentlich Insulin subkutan bekamen, wurden für weitere 12 Wochen mit dem neuen Aldosereduktasehemmer behandelt.

Die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Gruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

Die Tiere der Gruppe I blieben ohne jegliche Therapie und wurden mit normalem Laborfutter versorgt.

Die Tiere der Gruppe II blieben normalerweise ebenfalls ohne Insulin-Therapie, lediglich bei deutlicher Verschlechterung des Gesamtzustandes (Gewichtsabnahme, Immobilisierung oder hohe Blutzuckerwerte) wurden unterstützende Insulin Depot H Dosen gespritzt.

Die Tiere der Gruppe III wurden von Anfang an mit Insulin Depot H täglich behandelt; es wurden je nach Blutzuckerwert 10 bis 12 I.E. Insulin gespritzt.

Die Tiere der Gruppe IV aus Experiment A wurden von Anfang an mit dem Aldosereduktasehemmer behandelt.

Die Tiere der Gruppe IV aus Experiment B wurden, wie oben schon erwähnt, erst nach einem diabetischen Zeitraum von ca. 12 Wochen nach Diabetes-Induktion mit dem neuen Aldosereduktasehemmer behandelt. Die Behandlung erstreckte sich danach über einen weiteren Zeitraum von ca. 10 bis 12 Wochen. Beide Therapiegruppen blieben im Regelfall ebenfalls ohne Insulin-Therapie. Nur bei starker Verschlechterung des Allgemeinzustandes wurden unterstützend einige Einheiten Depot H gespritzt.

Das Medikament wurde in den Therapiegruppen den Tieren einmal täglich in einer Konzentration von 25 mg/kg Körpergewicht durch eine Magensonde zugeführt. Das Medikament wurde hierfür zuvor in Wasser aufgelöst.

Zur Feststellung der Stoffwechsellaage der Tiere wurden folgende Werte gemessen:

- Körpergewicht alle 1 bis 2 Wochen.
- Blutzucker (postprandial) mindestens 1 x wöchentlich.

Die Messung erfolgte mittels eines Reflocheck-II-Gerätes; bei stark geschwächten Tieren wurde auch eine häufigere Messung durchgeführt, dazu wurde jeweils Blut aus der Schwanzvene entnommen.

- HbA1c-Wert: a) Vor Untersuchungsbeginn
 b) Nach 2 bzw. 3 Monaten
 c) Nach 5 bzw. 6 Monaten

Der Hb-A1c-Wert wurde gemessen mittels eines Isolab Glyc-Assin-GHB und erfolgte durch die quantitative Bestimmung von Glykohämoglobin (GHB); dieses basierte auf der Trennung von Glykohämoglobin von anderem Hämoglobin durch Affinitätschromatographie. Den Hb-A1c-Wert kann man als eine Art Blutzuckergedächtnis betrachten, da er die Blutzuckerstoffwechsellaage der Versuchstiere für die Dauer der Erythrozyten-Überlebenszeit ca. 100 bis 120 Tage widerspiegelt. Der Normwert sollte bei guter Stoffwechselleistung unter 7 % liegen.

Die Messung des Hb-A1c-Wertes erfolgte vor Beginn des Versuches, nach 2 bis 3 Monaten und bei der Langzeit-Studie nach ca. 5 Monaten. Es zeigte sich, wie schon durch die Blutzuckerbestimmung nachgewiesen, dass die Ratten sicher

diabetisch wurden und ein Nachspritzen mit dem Inselzellgift STZ nicht erforderlich war.

2.2.2 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit:

Die motorische Nervenleitgeschwindigkeit ist eine in vielen Studien benutzte Größe zur Feststellung des Ausmaßes einer diabetischen Neuropathie.

Es wurden zur Messung jeweils große periphere motorische Nerven benutzt, wie z.B. der Nervus ischiadicus oder analog zur vorliegenden Studie der motorische Schwanznerv des Versuchstieres. Der Vorteil hierbei ist, dass man von außen relativ einfach und reproduzierbar die Elektroden einbringen kann und damit eine ziemlich sichere Reizinduktion und Reizableitung erreicht.

Die Tiere wurden jeweils kurz vor der Messung mit einer geringen Dosis Nembutal (Pentobarbital) narkotisiert. Die Dosis betrug abhängig vom Gewicht ca. 0,20 bis 0,25 mg pro kg Körpergewicht. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Damit waren die Ratten soweit sediert, dass eine unmittelbare Reaktion während der Messung nicht zu beobachten war. Die Betäubung hielt für die Dauer der Messung von ca. 10 bis 15 Minuten an. Danach wachten die Tiere langsam auf und waren voll mobil. In einigen wenigen Fällen kam es infolge schlechten Allgemeinzustandes der Tiere zu einem akuten Kreislaufstillstand während oder kurz nach der Messung, dies betraf besonders einige Tieren der Langzeit-Studie.

Da, wie schon frühere Arbeiten gezeigt hatten, die Temperaturkonstanz einen erheblichen Einfluss auf die Exaktheit der Messung hat (Yue et al. 1982), wurde auch bei diesem Versuchsaufbau darauf besonderes Augenmerk gelegt. Da die Messung am motorischen Schwanznerv durchgeführt wurde, war es wichtig, die Temperatur im Schwanz des Versuchstieres bzw. in unmittelbarer Nähe des Schwanzes konstant zu halten. Da die Lufttemperatur in einem geschlossenen Raum immer deutlich unter der Körpertemperatur liegt und eine bestimmte Konvektionsströmung stets vorhanden ist, wurde der Schwanz des Versuchstieres während der Messung in einen mit Öl gefüllten Metallbehälter eingebracht.

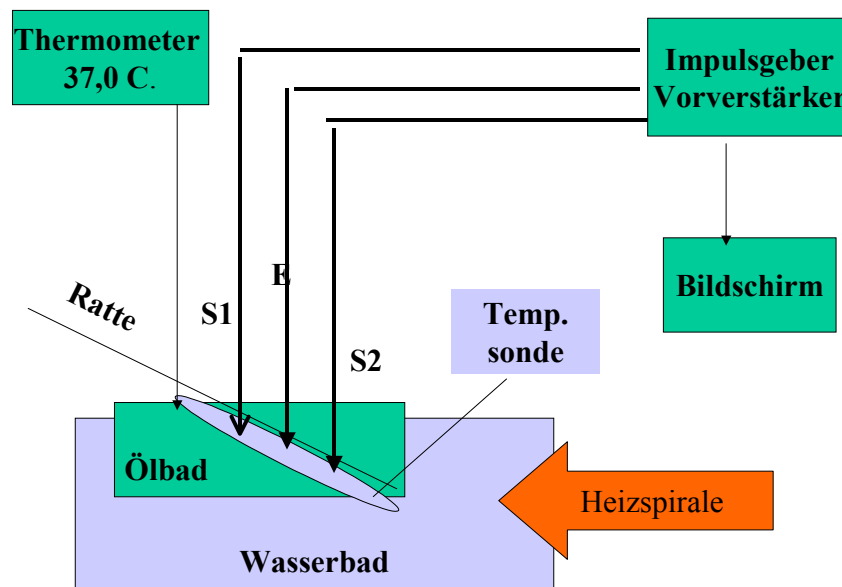
Dieser wiederum stand in einem Wasserbad, welches von einer Heizspirale auf einer konstanten Temperatur gehalten wurde. Nach Einbringen des Schwanzes in das Ölbad wurden jeweils einige Minuten abgewartet, um eine konstante Temperatur zu erreichen. Die Messung der Temperatur erfolgte durch eine Temperatursonde, die unmittelbar neben dem Schwanz lag. Die Messelektrode war mit einer digitalen Anzeige, die in 0,1 ° C-Schritten die Temperatur anzeigte, verbunden. Die Temperatur blieb während der Messung auf ca. 37,0 °C +/- 0,1 °C konstant eingestellt.

Die Ratten waren auf dem Rücken liegend auf einer leicht schräggestellten Korkplatte fixiert.

2.2.3 Anlegen der Messelektroden

Die Reizelektrode (S1) wurde ca. 1 cm distal des Schwanzansatzes eingebracht. In einem weiteren Abstand von ca.

6 cm erfolgte die Einsetzung der Ableit-Elektrode (S2), zwischen beiden Elektroden saß die Erdelektrode.



Es wurden nun ein elektrischer Impuls von einem Stimulator in die Reizelektrode eingeleitet. Die Impulsdauer war fest eingestellt, die Impulsstärke abhängig von der jeweiligen Kontaktfähigkeit bzw. von der Stärke des an der Ableit-Elektrode gemessenen Reizes. Nach erfolgter Leitung durch den Schwanznerv wurde der Impuls an der Ableit-Elektrode und über einen Vorverstärker einem Computer zugeführt.

Sowohl der Reizimpuls als auch der abgeleitete Impuls wurden auf einem Bildschirm mit Angabe der Reizschwelle in mV und Angabe der Nervenleitgeschwindigkeit in m/sec abgebildet. Dabei erfolgte der Ausdruck mit Angabe von Datum, Tiernummer, Gewicht, Menge des verwendeten Anästhetikums, Amplitudengröße in mV

über S1 und S2 sowie die daraus berechnete Nervenleitgeschwindigkeit in m/sec.

Die Messung erfolgte alle 6 Wochen, wobei alle Tiere vor Versuchsbeginn das erste Mal gemessen wurden, um den Ausgangswert zu ermitteln.

2.2.4 Morphologie

Zur Beurteilung morphologischer Veränderungen am Nerv der Versuchstiere wurden die Tiere jeweils nach Abschluss der letzten Messung, also für Experiment A nach ca. 5 bis 6 Monaten, für Experiment B nach ca. zwei bis drei Monaten, mit einer Überdosis Nembutal (Pentobarbital) getötet und danach sofort ausreichend lange Stücke des Nervus suralis und Nervus tibialis von jedem Tier entnommen und in Formalin fixiert.

Die Nerven wurden dann durch die Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration entwässert, danach in Epon eingebettet. Anschließend wurden am Anatomischen Institut Gießen lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Schnitte angefertigt.

2.2.5 Statistische Methoden

Unterschiede in der Nervenleitgeschwindigkeit zwischen den Therapiegruppen und den Messzeitpunkten „Versuchsbeginn“ und „Versuchsende“ wurden mittels Varianzanalyse getestet. Die Normalverteilung der Originaldaten wurde mit dem nach Lilliefors modifizierten Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft, die Homogenität der Varianzen mit Levene-Test. Aufgrund der starken Abweichungen von diesen Voraussetzungen einer Varianzanalyse

wurden die Daten potenztransformiert und die Varianzanalyse mit den transformierten Daten durchgeführt (Sokal und Rohlf 1981).

Da die Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren „Therapie“ und „Messzeitpunkt“ sowohl in der Reversibilitätsstudie als auch in der Inhibitionsstudie signifikant war, wurden die Unterschiede zwischen allen Kombinationen der beiden Faktoren mittels paarweisem Mittelwertvergleich auf Signifikanz getestet. Diese wurden mit dem Tukey-Test durchgeführt, bei dem das angegebene Fehlerniveau in der Gesamtheit aller Vergleiche eingehalten wird (Day und Quinn 1989).

Für die im Ergebnisteil angeführten signifikanten Unterschiede gilt bezüglich des Fehlers 1. Art, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, $p < 0,05$. Die Berechnungen wurden mit dem Statistikpaket SPSS 10.0 für Windows durchgeführt.

Literatur

Day, R.W., Quinn, G.P. (1989): Comparisons of treatments after an analysis of Variance in ecology. Ecological Monographs 59, S. 433-463

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1981): Biometry. 2. Aufl. Freeman and Company, New York, 859 S.

- Vor der Durchführung einer Varianzanalyse müssen die Voraussetzungen geprüft werden. Das Ergebnis der hier durchgeführten Tests auf Normalverteilung innerhalb der einzelnen Untergruppen und auf Homogenität der Varianzen

(=Gleichheit der Varianzen der einzelnen Untergruppen) befinden sich unter a) und b) auf den folgenden Seiten. Da in diesen Fällen die Nullhypothese beibehalten werden soll, sind große p-Werte „gut“. In diesem Fall also bei a): Die Messwerte sind normalverteilt, wenn $p < 0,05$ und bei b). Die Varianzen sind homogen, wenn $p > 0,05$.

- Bei der Varianzanalyse ergab sich, dass der Einfluss des Faktors Messzeitpunkt alleine nicht signifikant ist. Die Wechselwirkung der beiden Faktoren ist hingegen mit $p = 0,004$ hochsignifikant.

- Nachdem durch Varianzanalyse gezeigt wurde, dass die Wechselwirkung der Faktoren „Therapie“ und „Messzeitpunkt“ einen Einfluss auf die Nervenleitgeschwindigkeit hat, ist es noch interessant zu wissen, welche Therapiegruppe sich zu welchem Zeitpunkt von welcher unterscheidet. Daher wird ein paarweiser Mittelwertvergleich durchgeführt (siehe d). Hier wurde der Turkey-Test (englisch: Tukey's honestly significant difference test oder Tukey-HSD test) gewählt, da er das gewählte Fehlerniveau bei multiplem Testen einhält. Das Ergebnis des paarweisen Mittelwertvergleiches wird in Tabellen und Abbildungen dargestellt (in Tab. 2 durch unterschiedliche Buchstaben).

Tabellen siehe Anhang

ERGEBNISSE

3.1 Allgemeine Vorbemerkungen zum Ergebnisteil

Das Ziel dieser ca. 3 Monate andauernden Studie war, herauszufinden, ob der Aldosereduktasehemmer CP 73-850 in der Lage ist, eine Verschlechterung der Nervenleitgeschwindigkeit in den Nerv von durch Injektion mit STZ diabetisch gemachten Ratten zu verhindern.

Die Tiere wurden am Anfang des Versuches randomisiert in vier Gruppen verteilt:

1. Normalkontrolle.
2. 7 Tiere mit STZ-induziertem Diabetes ohne jegliche Therapie.
3. Therapiegruppe Insulin-Therapie: 15 Tiere mit STZ-induziertem Diabetes unter täglicher Insulin-Therapie mit Depot H Insulin.
4. Therapiegruppe Aldosereduktasehemmer: 12 Tiere mit STZ-induziertem Diabetes unter Therapie mit dem Medikament CP 73-850.

Es zeigte sich, dass die Tiere der Normalgruppe ohne jegliche Therapie im Verlauf des Versuches eine langsame Zunahme ihres Körpergewichtes zeigten. Am Versuchsende wogen diese Tiere zwischen 400 und 450 g, wobei das Ausgangsgewicht bei ca. 360 g lag.

Die Gewichtszunahme muss im Zusammenhang mit dem Alter der Tiere gesehen werden, da diese bei Versuchsbeginn erst ca. 12 Wochen alt waren und damit naturgemäß auch an Größe zunahmen. Bei diesen Tieren gab es keine weiteren Auffälligkeiten oder unerwartete Todesfälle, sie wurden unter normalen Laborbedingungen gehalten und mit normalem Laborfutter gefüttert.

Bei den rein diabetischen Tieren ohne jegliche Therapie kam es zu einem teilweise sehr starken Gewichtsabfall sowie zu einer starken Reduktion des Allgemeinzustandes. Dies führte auch zu einer relativ hohen Sterbequote der Tiere in dieser Gruppe. Den Tieren wurde teilweise zur Unterstützung ab und zu jeweils eine geringe Dosis Insulin gespritzt.

Die hohe Sterberate dieser Gruppe führte zu einer Negativ-Auslese dieser Versuchstiere, so dass nur die stoffwechselfähigsten Tiere mit den daraus folgenden auch geringeren metabolischen und morphologischen Veränderungen überlebten und damit letztlich auch in die Messung eingingen.

Auf die näheren Auswirkungen wird später noch ausführlich eingegangen.

Bei den Tieren der Inhibitionsstudie (diabetische Tiere unter Therapie mit dem Aldosereduktasehemmer von Beginn des Versuches an) ergab sich ein etwas besseres Bild. Hier zeigte sich ein durchschnittlich nicht so starker Gewichtsabfall, wenn auch die Sterbequote hier ebenfalls sehr hoch lag.

Bei den Tieren der Insulin-Therapie-Gruppe kam es bei einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht von ca. 400 g nur zu einem Gewichtsabfall auf ein Durchschnittsgewicht von ca. 350 g. Da diese Tiere eine tägliche Insulin Depot H Dosis von 8 bis 10 I.E. subkutan bekamen, war die Gesamtsituation besser und die prozentuale Sterbequote nicht so hoch wie bei den rein diabetischen Tieren der anderen Gruppen.

Auch hier war der relativ kurze Beobachtungszeitraum von ca. 3 Monaten von Vorteil.

Zur Sicherung eines manifesten Diabetes mellitus nach Injektion mit dem Inselzellgift STZ wurde bei allen Tieren eine HbA1c-Messung am Anfang sowie nach 2 bzw. 5 Monaten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Werte in der Normalgruppe zwischen 4 und 6,5 % lagen, also deutlich im gesunden Bereich.

Es wurden auch alle Tiere der anderen Therapiegruppen gemessen. Bei den ersten Kontrollen nach ca. 2 Monaten zeigte sich bei allen mit STZ diabetisch gemachten Tieren ein deutlich erhöhter HbA1c-Wert auf Werte bis teilweise über 12 %. Vor allem Tiere ohne jegliche Therapie zeigten durchschnittlich sehr hohe HbA1c-Werte.

Die Behandlung der diabetischen Tiere aus der Gruppe, die mit dem Aldosereduktasehemmer behandelt wurden, zeigte offensichtlich keinen Einfluss auf die langfristig erhöhten Blutzuckerspiegel. Dies war unabhängig davon, ob die Tiere von Anfang an (Inhibitionsstudie) oder erst nach einem Zeitraum von ca. 3 Monaten mit dem neuen Medikament behandelt wurden.

3.2 ERGEBNISSE AUS DER MESSUNG DER NERVENLEITGESCHWINDIGKEIT

3.2.1 Experiment A

Tabelle 1 der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit zeigt die Mittelwerte der jeweils pro Gruppe gemessenen Werte, zusammen mit der Standardabweichung und der Anzahl der Tiere pro Gruppe. Die Mittelwerte ergeben sich aus den Messungen nach 6 bzw. 12 Wochen.

Tabelle 1

Nervenleitgeschwindigkeit in (m/sec)

Gruppe	Zeit	Durchschnitt	Standardabw.	Anzahl n
Normalkontrolle II	Basalwert	38,12	0,94	7
	nach 6 Wo.	39,66	0,71	7
	nach 12 Wo.	39,94	0,65	7
Diab. Kontrolle II	Basalwert	37,07	1,45	8
	nach 6 Wo.	34,07	1,54	8
	nach 12 Wo.	35,81	1,59	8
Insulintherapie II	Basalwert	36,91	1,61	7
	nach 6 Wo.	34,46	2,2	7
	nach 12 Wo.	36,57	1,44	7
Inhibitionsstudie	Basalwert	33,98	2,74	7
	nach 6 Wo.	34,36	1,92	7
	nach 12 Wo.	35,98	1,1	7

Bei der Normalkontrolle II (7 Tiere über 3 Monate) zeigte sich ein leichter Anstieg der Nervenleitgeschwindigkeit, was durchaus mit dem Alter der Tiere bei Versuchsbeginn in Verbindung zu bringen

ist. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn erst ca. 3 Monate alt und damit noch nicht voll ausgewachsen. Auch in anderen Studien, die mit Laborratten durchgeführt wurden, zeigte sich im Verlauf mit dem Älterwerden der Tiere ein leichter Anstieg der Durchschnittswerte der Nervenleitgeschwindigkeit.

Bei den Tieren der diabetischen Kontrolle II (8 Tiere über ca. 23 Monate) zeigte sich ein leichter Abfall der Nervenleitgeschwindigkeit bei der ersten Messung nach einem diabetischen Zeitraum von ca. 6 Wochen. Danach stieg die Nervenleitgeschwindigkeit leicht an. Der Wert nach 3 Monaten lag allerdings unter dem Ausgangswert und war deutlich schlechter als der Durchschnittswert der gesunden Kontrolltiere.

Hierbei spielt mit Sicherheit auch die erhöhte Negativ-Auslese durch die hohe Sterblichkeit der Tiere eine nicht unerhebliche Rolle. Die Sterblichkeit unter den rein diabetischen Tieren ohne jegliche Therapie lag bei ca. 50 %, wobei teilweise starke Gewichtsabnahme sowie Lähmungserscheinungen der unteren Extremitäten zu beobachten waren. Trotz intensiver Überwachung in besonders schweren Fällen und unterstützend gespritzten Insulin-Einheiten war eine höhere Überlebensrate nicht zu erreichen. Wie auch die HbA1c-Werte zeigen, war die diabetische Stoffwechsellage teilweise sehr ausgeprägt.

Bei den Tieren der Insulintherapie II waren die durchschnittlichen Werte der Nervenleitgeschwindigkeit am Ende des Versuches nach ca. 3 Monaten ungefähr so hoch wie am Beginn des Experimentes. Da die Therapie intensiv mit täglicher Insulingabe durchgeführt wurde, waren diese Tiere in einer allgemein

besseren Verfassung als die Tiere der diabetischen Kontrolle II. Die HbA1c-Werte lagen hier auf einem etwas niedrigen Niveau als bei den diabetischen Kontrolltieren.

In der Inhibitionsstudie (nach STZ-Gabe sofortiger Therapiebeginn) zeigte sich ein sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen leicht erhöhter Durchschnittswert der Nervenleitgeschwindigkeit. Hier kam es nicht wie in der diabetischen Kontrollgruppe bzw. in der Insulintherapie-Gruppe zu einem Abfall der Nervenleitgeschwindigkeit.

Das sehr hohe Niveau der zum Vergleich herangezogenen Normalgruppe wurde auch hier nicht erreicht.

Dass die Unterschiede zur diabetischen Kontrollgruppe II nicht höher ausfielen, liegt auch hier mit großer Wahrscheinlichkeit an der sehr hohen Sterblichkeit in dieser Gruppe. Die sehr stark geschädigten Tiere mit den dann wahrscheinlich auch sehr ausgeprägten metabolischen und morphologischen Veränderungen konnten dadurch nicht mehr gemessen werden.

Da die prozentuale Sterblichkeit in der Inhibitionsstudie nicht so hoch lag, ist davon auszugehen, dass auch all die Tiere in die Messung eingingen, die über typische Schädigungen im Rahmen der diabetischen Stoffwechsellaage verfügten. Damit wäre eine mögliche Erklärung dafür gefunden, dass die Unterschiede nicht so deutlich ausfielen wie zu erwarten wäre.

3.2.2 Experiment B

In dieser Gruppe wurden die Tiere, nachdem sie durch eine anfängliche STZ-Injektion diabetisch gemacht worden waren, über einen Zeitraum von ca. 2 bis 3 Monaten ohne jegliche Therapie gelassen. Nach diesem Zeitraum wurde eine Kontrollmessung der Nervenleitgeschwindigkeit sowie der HbA1c-Werte durchgeführt. Danach begann die Therapie mit dem Aldosereduktasehemmer CP 73-850 über weitere 3 Monate.

Tabelle 2 der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit zeigt die Mittelwerte der jeweils pro Gruppe gemessenen Werte, zusammen mit der Standardabweichung und der Anzahl der Tiere pro Gruppe. Die Mittelwerte ergeben sich aus den Messungen nach 12, 18 bzw. 24 Wochen.

Tabelle 2

Nervenleitgeschwindigkeit in (m/sec)

Gruppe	Zeit	Durchschnitt	Standardabw.	Anzahl n
Normalkontrolle I	Basalwert	38,39	0,94	7
	nach 12 Wo.	39,16	0,93	7
	nach 18 Wo.	39,53	0,73	7
	nach 24 Wo.	38,98	0,7	7
Diab. Kontrolle II	Basalwert	35,12	1,73	7
	nach 12 Wo.	34,08	1,86	7
	nach 18 Wo.	36,13	1,88	7
	nach 24 Wo.	36,05	1,54	7
Insulintherapie II	Basalwert	34,36	2,27	7
	nach 12 Wo.	34,04	2,37	7
	nach 18 Wo.	37,52	0,57	7
	nach 24 Wo.	37,03	1,54	7
Reversibilitätsstudie	Basalwert	38,24	1,07	7
	nach 12 Wo.	35,55	0,83	7
	nach 18 Wo.	37,03	0,85	7
	nach 24 Wo.	37,61	0,43	7

In der Normalkontrolle I blieb die Nervenleitgeschwindigkeit erwartungsgemäß auf einem sehr hohen, gleichbleibenden Niveau bis zum Ende des Versuches.

In der Gruppe der völlig unbehandelten diabetischen Tiere kam es bei der ersten Messung nach ca. 6 Wochen zu einem deutlichen Abfall der Nervenleitgeschwindigkeit und bei der zweiten Messung zu einem Anstieg der Durchschnittswerte, die bis zum Ende des Versuches auf diesem hohen Niveau blieben. Die Enddurchschnittswerte lagen damit sogar noch auf einem etwas höheren Niveau als am Anfang der Messung.

In der diabetischen Kontrollgruppe I, die von Anfang an mit Insulin behandelt wurde, war der Abfall der Nervenleitgeschwindigkeit nicht so hoch. Bei der zweiten und dritten Messung kam es zu einem deutlichen Anstieg: Hier lagen die letzten Messungen noch über den Ausgangswerten.

In der Gruppe der Tiere der Reversibilitätsstudie, die nach einem diabetischen Zeitraum von 2-3 Monaten mit dem neuen Medikament behandelt wurden, zeigte sich bei der ersten Messung nach 6 Wochen ohne jegliche Therapie ein starker Abfall der Nervenleitgeschwindigkeit. Danach kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Werte bis zum Ende des Versuches. Hier wurden die hohen Ausgangswerte nicht mehr ganz erreicht. Wie bei den Tieren im Experiment A spielt auch hier die sehr hohe Sterblichkeit, vor allem in den unbehandelten Versuchstiergruppen, eine entscheidende Rolle. Damit wäre vor

allem der untypische Anstieg der Nervenleitgeschwindigkeit bei den diabetischen Tieren ohne jegliche Behandlung zu erklären. Durch die oben schon erwähnte Negativ-Auslese wurden nur die Tiere gemessen, die wahrscheinlich die geringeren metabolischen und morphologischen Veränderungen aufwiesen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Therapie mit einem Aldosereduktaseinhibitor (ARI) auf die Nervenleitgeschwindigkeit von diabetischen Ratten untersucht.

Die Studie hatte eine Dauer von maximal 6 Monaten.

Zielparameter waren vor allem die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit, der Verlauf der Gewichtsveränderung der Tiere sowie der Verlauf der Blutzuckerwerte und die Entwicklung des HbA1c-Wertes.

Es konnte bei der Mehrzahl der untersuchten Behandlungsgruppen kein Unterschied zwischen Therapiegruppen und diabetischen Kontrollgruppen festgestellt werden.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um spezielle Inzuchtratten, Typ Wistar, die zu Beginn des Versuches ca. 3 Monate alt waren. Alle Tiere waren gesund und zeigten keinen spontanen Diabetes oder andere Beeinträchtigungen. Die Auswirkung vom Aldosereduktaseinhibitor (CP 73-850) auf die motorische Nervenleitgeschwindigkeit der Tiere waren der zentrale Messparameter dieser Arbeit. Zur Dokumentation der morphologischen Veränderungen am motorischen Nerv wurden elektronen- und lichtmikroskopische Schritte angefertigt.

Wie schon in früheren Arbeiten gezeigt, eignet sich die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) sehr gut zur Quantifizierung von morphologischen Veränderungen am Nerv selber. Sie stellt

eines der wenigen Kriterien dar, die reproduzierbar und standardisierbar sind.

Obwohl in einigen Arbeiten gezeigt wurde, dass es durchaus Fälle gibt, in denen eine Diskrepanz zwischen schweren Verlaufsformen des Diabetes mellitus und nur gering auftretenden morphologischen Veränderungen am Nerv selber auftritt (nachweisbar an der nur sehr geringen Verschlechterung der NLG), ist die Störung der motorischen NLG eines der am weitesten verbreitetsten Symptome der peripheren diabetischen Neuropathie.

Die Messung selber ist wohl im Tierversuch als auch in klinischen Studien relativ einfach durchführbar und reproduzierbar, da jeweils die peripheren motorischen Nerven zur Messung herangezogen werden.

Die Tiere waren zu Anfang der Versuchsreihen unter normalen Laborbedingungen gehalten und einige Tage lang mit dem üblichen Laborfutter versorgt worden.

Die Tiere zeigten alle eine normale Motorik und ein gleichmäßig verteiltes Ausgangsgewicht. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere lag bei Versuchsbeginn deutlich über 300 g und erreichte bei den gesunden – nicht diabetischen Tieren – ein durchschnittliches Körpergewicht von mehr als 500 g. Auch konnte eine gewisse Größenzunahme der gesunden Tiere nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass die Tiere bei Versuchsbeginn noch nicht ganz ausgewachsen waren.

Auffallend war, dass im Laufe der Versuchsreihe bei den Ratten der diabetischen Gruppen, die ohne Therapie blieben, die Tiere

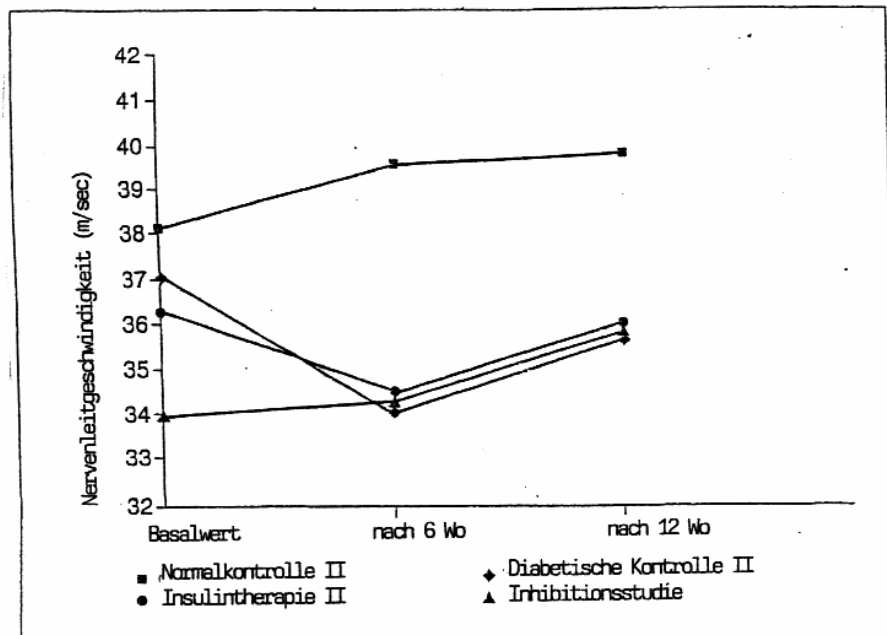
eine massiv zunehmende Gewichtsabnahme sowie eine daraus resultierende Immobilität zeigten. Bei einigen Versuchstieren war hier kurz vor dem Tod eine Art Lähmung der unteren Extremitäten festzustellen. Inwieweit hier schon eine massive Polyneuropathie vorgelegen hat und damit verantwortlich war für die fortschreitende Lähmung, lässt sich nur vermuten. Genaue morphologische Untersuchungen der Tiere konnten nicht rechtzeitig erstellt werden.

Es kam in einigen Gruppen zu einer Letalität von 50 %. Durch diese hohe Rate wurden vermutlich die Tiere mit schwersten morphologischen Veränderungen herausselektiert, während hingegen die resistenteren Tiere, bzw. die Tiere, wo es nicht zu einer massiven Polyneuropathie gekommen ist, überlebten. Dadurch kam es mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Verfälschung der Messergebnisse, auf die noch im einzelnen eingegangen wird.

4.1 Experiment A

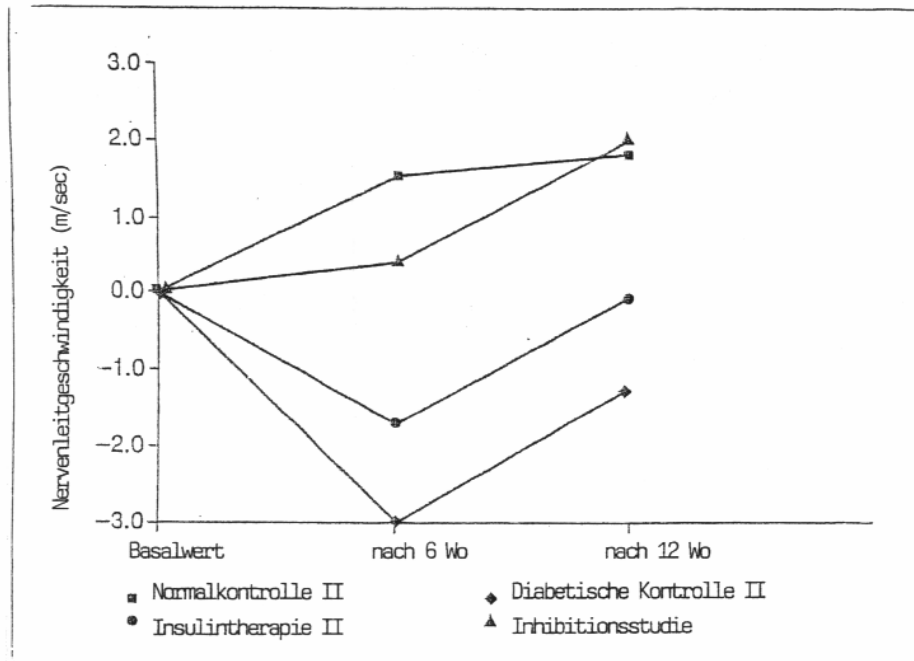
Diese Arbeit befasste sich mit den Auswirkungen der Therapie eines Aldosereduktasehemmers (ARI) über einen Zeitraum von ca. 12 Wochen. In der Tabelle 1 sowie in Figur 1A ist zu erkennen, dass schon die durchschnittlichen Ausgangswerte der Nervenleitgeschwindigkeit der gesunden Tiere initial sehr stark differenzierten.

Figur 1a



Dies zeigt sich vor allem in der Darstellung der absoluten Werte, wo zwischen der durchschnittlichen maximalen Nervenleitgeschwindigkeit und der Normalkontrolle der durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeit der Therapiegruppe eine Differenz von ca. 4 m/s liegt. Diese Messergebnisse machen den Vergleich der unterschiedlichen Gruppen von Anfang an sehr schwierig. Signifikanter werden die Ergebnisse, wenn man die absoluten Differenzen gegenüber der Null-Linie aufträgt, wie es in Figur 1B zu sehen ist. Hierbei erhält man den Eindruck, dass vor allem die Tiere, die über den gesamten Zeitraum mit dem Aldosereduktasehemmer behandelt worden sind, hiervon eher profitieren würden. Das wird sichtbar an der gegenüber der Basislinie deutlich zunehmenden Nervenleitgeschwindigkeit. Dies trifft auch für die Normalkontrolle, bzw. die gesunden, nichtdiabetischen Tiere zu.

Figur 1b



Wie oben schon erwähnt, macht sich hierbei die sehr hohe Sterblichkeit der Therapiegruppe bemerkbar, so dass nur weniger als 50 % der Tiere überlebten und es sich damit um eine positive Auslese gehandelt haben könnte.

Daher ist die Interpretation der Daten nur eingeschränkt möglich. Trotzdem ist zu bemerken, dass vor allem die Messwerte für die rein diabetischen Tiere der Kontrollgruppe als auch die Messwerte für die diabetischen Tiere, die mit Insulin behandelt wurden, sehr stark gegenüber der Basislinie abgefallen waren. Dies wiederum passt zu den Versuchsergebnissen, die auch schon in früheren Studien erhoben wurden. Hierbei wurde nachgewiesen, dass bei den Tieren, die einen manifesten Diabetes hatten, und ohne jegliche Therapie blieben, eine deutliche Verschlechterung der Nervenleitgeschwindigkeit zu verzeichnen war. Allerdings waren

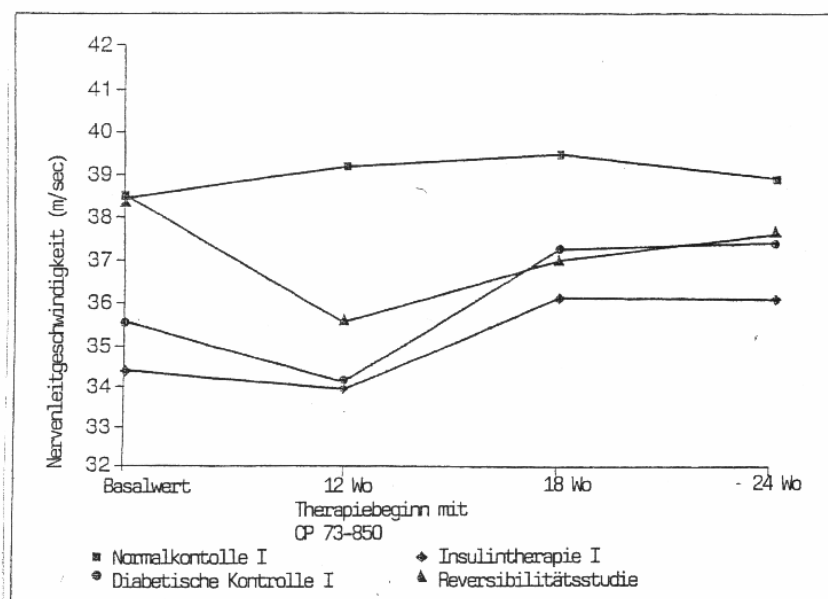
die Ergebnisse, sowohl in Kurzzeitstudien über wenige Tage als auch bei Langzeitstudien über maximal ein Jahr erhoben worden. Deshalb bleibt auch hier die Vergleichbarkeit sehr schwierig.

4.2 Experiment B

In Experiment B wurde untersucht, ob durch die Medikation mit dem Aldosereduktasehemmer eine Reversibilität von bereits manifesten Störungen der Nervenleitgeschwindigkeit erreicht werden konnte. Hierzu wurde mit Beginn der Therapie auf einen Zeitraum von ca. 3 Monaten nach Induktion der diabetischen Stoffwechsellage durch das Inselzellgift Streptozotocin begrenzt.

Auch in diesem Experiment fielen die anfänglich sehr hohen Differenzen zwischen den durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeiten der einzelnen Gruppen am Beginn des Experimentes auf, erkennbar an den Werten in der Tabelle 2 und in Figur 2a.

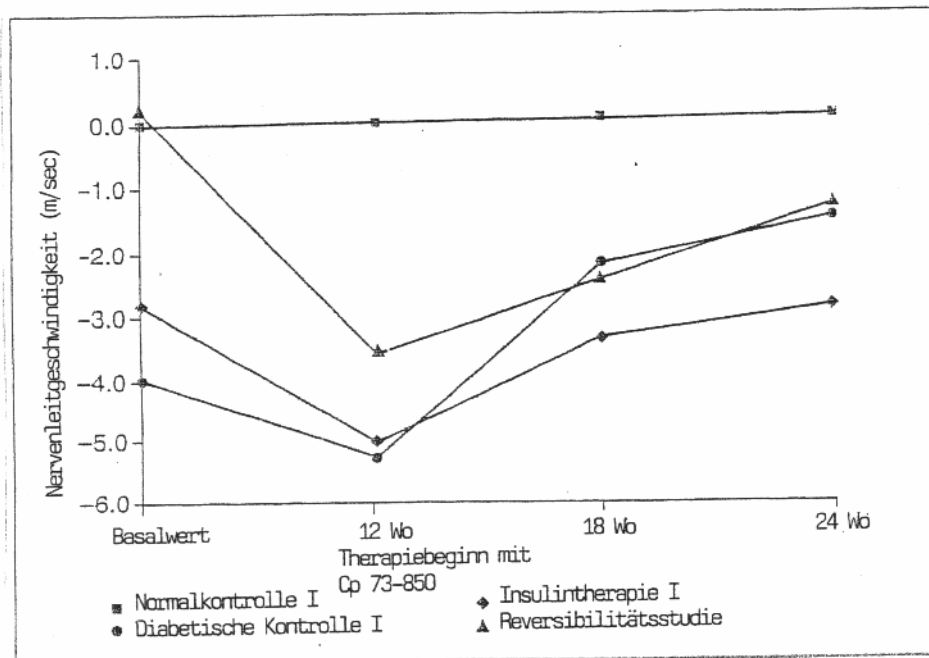
Figur 2a



Zwischen dem minimalen Wert der durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeiten und dem maximalen Wert lag die Differenz von ca. wiederum 4 m/s. auf.

Der Vergleich der absoluten Veränderung gegenüber der Null-Linie zeigte keine statistisch verwertbaren Werte.

Figur 2b



Auch bei diesem Experiment war es ein großer Nachteil, dass die Sterblichkeit der Tiere der rein diabetischen Gruppen sehr hoch war. Die überlebenden Tiere in der Therapiegruppe zeigen daher nicht repräsentative Werte. Die überlebenden Tiere hatten wahrscheinlich eine gewisse Resistenz gegenüber einem stark erhöhten Blutglukosespiegel, bzw. entwickelten keine Zeichen einer schweren diabetischen Polyneuropathie. Dies würde auch

den relativen Anstieg der durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeit gegen Ende des Versuches erklären.

Dieser Anstieg konnte in allen Gruppen (diabetische Kontrolle, Therapiegruppe, diabetische Kontrolle mit Insulintherapie) nachgewiesen werden. Wiederum ist davon auszugehen, dass es sich also auch hierbei um eine positive Auslese gehandelt hat. Dadurch überlebten vor allen Dingen die "gesünderen Tiere".

4.3 Kritische Gesamtwertung der Ergebnisse

Die diabetische periphere Neuropathie ist eine weitverbreitete und für den Patienten sehr qualvolle Komplikation des Diabetes mellitus. Die Pathogenese dieser Komplikation hat bisher mehrere Erklärungsansätze und Modellvorstellungen hervorgebracht, ohne dass letztendlich eine befriedigende Lösung gefunden worden wäre. Die einzelnen biochemischen Veränderungen und den Folgerungen für die motorischen Nerven bleiben letztendlich unklar.

Bleibende Veränderungen in diabetischen Nerven wie erhöhte Sorbitol-Konzentrationen, Verringerung des Myoinositol-Gehaltes, steigende Glykosierung der Proteine und Veränderungen im Aufbau des Myelin-Lipides und wachsender Permeabilität der Nervenfasern sind beobachtet worden. Beobachtete morphologische Veränderungen umfassen segmentale Demyelisation, endoneurales Oedem und distale Axon-Degeneration.

Die Sorbitolanreicherung durch den Polyol-Zyklus gilt als hauptverantwortlich für den Mechanismus der Nerven-Dysfunktion in der diabetischen Neuropathie. Angenommen wird, dass die erhöhten Sorbitol-Konzentrationen zum Anstieg des osmotischen Druckes in den Schwann'schen Zellen führt und dadurch die Synthese und Funktion von Myelin beeinflusst. Andererseits führt die angestiegene Sorbitolkonzentration zur erhöhten Fruktose-Akkumulation im Endoneurium, es resultiert ein verstärktes endoneurales Oedem im diabetischen Nerv. Dieses Oedem könnte die Hauptursache für die verminderte Fortleitung der elektrischen Impulse sein.

Viele Untersuchungen haben die Anwesenheit von hohen Sorbitol-Konzentrationen im diabetischen peripheren Nerv sowohl in klinischen Versuchen als auch in Tierversuchen nachgewiesen. Bis jetzt konnte der direkte Beweis, dass allein die Sorbitolkonzentration verantwortlich ist für die Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit, nicht schlüssig geführt werden.

Die Behandlung mit Insulin verringert die Sorbitolkonzentration und verbessert die Nervenleitgeschwindigkeit.

Weiterhin wird durch Insulintherapie auch die hyperglykämische Stoffwechsellage normalisiert und einige andere metabolische Störungen positiv beeinflusst, die im Rahmen eines langdauernden Diabetes aufgetreten sind. Der Hauptfaktor für die Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit kann bisher nicht eindeutig benannt werden. Die Wirksamkeit von Aldosereduktaseinhibitoren wurde aber in vielen vorhergehenden Studien in klinischen und Tierversuchen ausführlich untersucht. Die Ergebnisse waren dabei sehr unterschiedlich, sie reichten von signifikanten Verbesserungen der Nervenleitgeschwindigkeit bis zu Studien ohne irgendeinen Verbesserungseffekt.

Ein immer wiederkehrendes Problem war die in den klinischen Studien teilweise auftretenden toxischen Nebenwirkungen der Medikamente, die führte in einigen Fällen sogar zum Widerruf der Zulassung eines Medikamentes, das schon seit einem Jahr auf dem Markt war. Dies erklärt auch die wachsende Zahl von neuen Aldosereduktaseinhibitoren, die entwickelt wurden, um eine möglichst große Effektivität bei der Minimierung der Nebenwirkungen zu erreichen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Therapie der gestörten peripheren Nervenleitgeschwindigkeit, verursacht durch eine chronische diabetische Stoffwechsellaage, weiter einen hohen Stellenwert haben wird. Der Therapieeinsatz durch Unterbrechung des Polyol-Zyklus mit Hilfe eines Aldosereduktaseinhibitors sowohl primäre als auch sekundäre Schädigung am Nerv zu verhindern, hat sich in der Vergangenheit als sehr erfolgversprechend herausgestellt. In vielen Arbeiten konnte ein positiver Effekt nachgewiesen werden. In zahlreichen Arbeiten fielen die Ergebnisse nicht ausreichend signifikant aus, dies ist auch in der vorliegenden Arbeit der Fall. Dies mag in vielen Fällen an der nicht standardisierten Messmethode als auch an dem Versuchsaufbau selber liegen. Gerade bei klinischen Therapieversuchen zeigen sich die Schwierigkeiten, dass die subjektive Empfindung der gestörten Nervenleitgeschwindigkeit der Patienten sehr stark differieren, wobei hier allerdings mehrere verschiedene Messparameter, wie gestörte Reflexe, gestörte Tiefensensibilität, gestörte Temperaturempfindung oder auch motorische Störungen erfasst und damit auch verglichen werden konnten. Hier stand

eine Vielzahl von Parametern zur Messung und Auswertung zur Verfügung.

Allerdings fehlt hierbei fast völlig der morphologische Aspekt, während elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen peripherer Nerven intra vitam nicht möglich sind. Hier muss man jeweils auf Material zurückgreifen, das post mortem gewonnen wurde. Hierbei hat man allerdings auch die Problematik der begrenzten Anzahl als auch

die schon vorher erwähnten signifikanten Unterschiede zwischen der Klinik des Patienten und entsprechenden morphologischen Veränderungen.

Diese Problematik zeigt sich auch im Tierversuch, wo man eine Vielzahl von morphologischen Präparaten zur Verfügung hat, jedoch nicht immer ein signifikanter Nachweis, bzw. ein Zusammenhang zwischen Veränderungen am Nerv selber und der Klinik herausarbeiten lässt. Der Nachweis von elektrophysiologischen Veränderungen im Tierversuch ist fast ausschließlich auf die großen peripheren motorischen Nerven beschränkt (z.B. Nervus ischiadicus als auch der motorischen Schwanznerven). Weitere Messungen sind zu klinischen Studien nahezu unmöglich. Es hat sich aber gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit in dem Versuch sehr hoch war.

Es gelang problemlos, im Nerv durch die Reizelektrode einen Impuls auszulösen und dann abzuleiten.

Auch mehrmalige Nachmessungen ergaben reproduzierbar ähnliche Werte. Daher halten wir die Messtechnik für durchaus ausgereift und weiterhin anwendbar. Es sollte allerdings auf eine exakte Umgebungstemperatur am Nerv selber geachtet werden,

da sich schon durch geringe Abweichungen eine deutliche Veränderung der Nervenleitgeschwindigkeit ergeben würde.

Dies wurde im hier vorliegenden Versuchsaufbau weitgehend ausgeschlossen.

Das Problem der hohen Tiersterblichkeit wurde auch in anderen Studien immer wieder erwähnt. Es lässt sich minimieren einerseits durch die Auswahl von resistenten Tieren, andererseits von ausgewachsenen Tieren, wobei die wachstumsbedingte Änderung der Nervenleitgeschwindigkeit nicht mehr so signifikant ausfallen dürfte.

5. Zusammenfassung

Der in dieser Arbeit eingesetzte Aldosereduktaseinhibitor CP-73-850 zeigte in der vorliegenden Studie keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Entwicklung oder die Reversibilität einer gestörten Nervenleitgeschwindigkeit. Dennoch sieht man vor allem bei der Darstellung der absoluten Differenzen gegenüber der Null-Linie, dass Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen aufgetreten sind.

Das Hauptproblem dieser Arbeit waren die stark differenzierenden Ausgangswerte der durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeit der Tiergruppen. Dieses Problem trat sowohl im Tierexperiment A als auch im Experiment B gleichermaßen auf. Dafür findet sich z.Z. leider keine plausible Erklärung, da alle Messungen unter standardisierten Rahmenbedingungen durchgeführt wurden. Auch erfolgte eine randomisierte Auswahl der Versuchstiere, die zu Versuchsbeginn alle gleich alt waren.

Sicher nachweisbar blieb, dass bei allen Tieren nach Injektion des Inselzellgiftes Streptozotocin eine zuverlässige diabetische Stoffwechsellaage eintrat, nachgewiesen durch den Verlauf der HbA1c-Werte der Tiere.

Weiterhin wurde sicher nachgewiesen, dass die Nervenleitgeschwindigkeit der diabetischen Tiere mit oder ohne Therapie primär stark abfiel, während die Messwerte der Normalgruppe immer auf dem gleichen Niveau blieben bzw. gegen Ende des Versuches leicht anstiegen. Dies ist zu erklären

durch das Älterwerden der Tiere mit der damit zusammenhängenden verbesserten Nervenentwicklung.

Die bei den Experimenten A und B nachzuweisende Änderung der Nervenleitgeschwindigkeit unter Therapie mit dem Aldosereduktaseinhibitor, als auch unter Therapie mit Insulin, wurde auch durch die sehr hohe Sterblichkeit der Versuchstiere erklärt.

Hieran sieht man auch, dass die Tiere, die überlebten, durchaus von der Therapie mit dem neuen Medikament profitierten, was an der leicht angestiegenen Nervenleitgeschwindigkeit zu sehen war. Die Entwicklung der Nervenleitgeschwindigkeit bei den rein diabetischen Tieren und ohne jegliche Therapie wurde am stärksten durch die hohe Mortalität belastet. Hier lag die Rate der vor Versuchsende gestorbenen Tiere bei 50 %. Damit ist auch die gegen Ende des Versuches sich verbessernde NLG zu erklären, die daraus resultiert, dass nur die widerstandsfähigsten Tiere überlebten.

Allerdings erhielt man beim Umgang mit den Versuchstieren den Eindruck, dass vor allem Tiere der beiden Therapiegruppen einen aktiveren und insgesamt gesünderen Eindruck hinterließen als die Tiere der diabetischen Kontrollgruppe. Dies war auch im Verlaufe der Gewichtsänderung der Tiere zu sehen. Der Gewichtsverlust fiel weniger dramatisch aus als der bei den Vergleichstieren, auch musste seltener zur Unterstützung der Tiere Insulin nachgespritzt werden.

Abschließend kann man sagen, dass zur Beurteilung der Wirksamkeit von Aldosereduktaseinhibitoren zur Verbesserung der diabetischen Polyneuropathie die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit im Tierversuch ihren festen Stellenwert hat. Unter weitgehend standardisierten Messbedingungen lassen sich vergleichbare Werte ermitteln. Solche Versuchsreihen stellen weiterhin einen wichtigen Beitrag zur Vorbereitung auf spätere klinischen Studien dar.

Dann sollte nach Möglichkeit eine weitere Auswertung der Messparameter z.B. durch Messungen des Myoinositol-, bzw. Fruktosegehaltes im Nerv selber durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht dann dahingehend auch durch elektronenmikroskopisch und lichtmikroskopische Reihenuntersuchungen die morphologischen Veränderungen am Nerv selber nachzuweisen. Diese Untersuchungen wurden ansatzweise hier im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, brachten allerdings keinen Zusammenhang zwischen den morphologischen Veränderungen und der Schwere der diabetischen Polyneuropathie.

Die einzig konstant nachzuweisende Veränderung bleibt die Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit im Organismus bei einer konstanten langandauernden diabetischen Stoffwechsellage.

Unbestritten bleibt die Tatsache, dass nur eine optimale Einstellung der diabetischen Stoffwechsellage des Patienten eine Entwicklung der schweren Folgeschäden eines langdauernden Diabetes mellitus wenn nicht verhindern, so doch zumindest längerfristig aufschieben kann.

In der Praxis ist dies durch vielfältige Probleme nicht immer möglich. Mangels Schulung oder mangels Patienten-Compliance, kommt es leider immer wieder zu länger dauernden diabetischen Stoffwechsellagen, die dann zu einer Entwicklung der früher oder später auftretenden schweren diabetischen Komplikationen führen. Dabei wird die diabetische Polyneuropathie, die mit starken Schmerzen verbunden sein kann, von dem Patienten als am meisten belastend empfunden.

Therapieansätze mit verschiedensten Analgetika brachten bis jetzt noch keinen durchschlagenden Erfolg.

Wie sich in letzten Jahren mehr und mehr herausstellte, beginnen die Veränderungen am Nerv bei auch latent diabetischer Stoffwechsellage schon wesentlich früher als bis jetzt gedacht.

Es gibt Hinweise, dass die Patienten schon eine Neuropathie entwickeln bevor durch zufällige Laboruntersuchungen eine Manifestation des Diabetes mellitus festgestellt wird.

Unzweifelhaft hat der Polyol-Zyklus, wie oben schon erwähnt und die damit sich am Nerv stark erhöhte Ansammlung von toxischen Substanzen einen massiven Einfluss auf das Voranschreiten der Neuropathie.

Die Unterbrechung des Polyol-Zyklus und die damit unterbrochene Akkumulation von toxischen Substanzen am Nerv scheint hierbei sehr erfolgversprechend zu sein. Daher ist es weiter ein wichtiges Ziel, möglichst potente Aldosereduktaseinhibitoren mit weitgehend reduzierten Nebenwirkungen zu produzieren.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass es durchaus möglich ist, durch Messungen der Nervenleitgeschwindigkeit am peripheren

motorischen Nerv standardisierte und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Der Versuchsaufbau lässt sich für weitere Arbeiten mit anderen Medikamenten erfolgversprechend einsetzen.

Für zukünftige Studien wäre eine eventuelle Verringerung der Versuchsdauer sowie eine verbesserte Auswahl der Versuchstiere sinnvoll, auch sollte eine intensive Betreuung und Versorgung der Tiere gewährleistet sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Archer, AG, Watkins, PJ, Thomas, PK, Sharma, AK, Payan, J.: The antural history of acute painful neuropathy in diabetes mellitus.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 1983, 46, 491-499
2. Assalt u. Lingier, 1986
3. Berti-Mattera, L, Day, N, Peterson, RG, Eichberg, J:
An aldose reductase inhibitor but not myo-inositol blocks enhanced polyphosphoinositide turnover in peripheral nerve from diabetic rats.
Metabolism 1996, 45 (3), 320-327
4. Boulton, AJM, Knight, G, Drury, J, Ward, JD:
The prevalence of symptomatic, diabetic neuropathy in an insulin-treated population.
Diabetes Care 1985, 8, 125-128
5. Boulton, AJM, Levin, S, Comstock, J.:
A multicentral trial of aldose-reductase inhibitor, tolrestat, in patients with symptomatic diabetic neuropathy.
Diabetologia 1990, 33, 431-437
6. Brown, Greene, 1984
7. Cameron, NE, Leonard, MB, I. S. Ross, IS, Whiting, PH:
The Effects of Sorbinil on peripheral nerve conduction velocity, polyol concentrations and morphology in the streptozocin-diabetic rat.
Diabetologica 1986, 29, 168 – 174.
8. Cameron, NE, Cotter, MA, Robertson, S:
The effect of aldose reductase inhibition on the pattern of nerve conduction deficits in diabetic rats.
Quart. J. Exp. Physiol. 1989, 74, 917-926

9. Cameron, NE, Cotter, MA:
Dissociation between biochemical and functional effects on the aldose reductase inhibitor, ponalrestat, on peripheral nerve in diabetic rats.
Br. J. Pharmacol. 1992, 107, 939-944
10. Cogan, DG.:
Aldose reductase and complications of diabetes.
Annals of internal Medicine 1984, 101, 82-91
11. Cohen, MP, Klepser, H.:
Glomerular Na⁺ - K⁺ - ATPase activity in acute and chronic diabetes and with aldose reductase inhibition.
Diabetes 1988, 43, 588 – 562
12. Coppey, LJ, Gellett, JS, Davidson, EP, Dunlap, JA, Yorek, MA:
Effect of treating streptozotocin-induced diabetic rats with sorbinil, myo-inositol or aminoguanidine on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity and vascular function of epineurial arterioles of the sciatic nerve.
Int. J. Exp. Diabetes Res. 2002, 3 (1), 21-36
13. Cotter, MA, Cameron, NE, Hohman, TC:
Correction of nerve conduction and endoneurial blood flow deficits by the aldose reductase inhibitor, tolrestat, in diabetic rats.
J. Peripheral Nerv. Syst. 1998, 3, 217-223
14. Day, R.W., Quinn, G.P. (1989):
Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology.
Ecological Monographs 59, S. 433-463
15. Dvornik, D.:
Hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic

- complications. In: Porte, D.: Aldose reductase inhibition, an approach to the prevention of diabetic complications, McGraw-Hill, New York 1987, p. 69-151
16. Greene DA; DeJesus PV; Winegrad AL:
Effects of insulin and dietary myoinositol on impaired motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes.
Journal of Clinical Investigation 1975, 55, 1326 – 1336
 17. Greene DA; Lattimer SA, Sima AA.:
Are Disturbances of Sorbitol, Phosphoinositide, and Na- K-ATPase-regulation involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy?
Diabetes 1988, 37, 688 – 693
 18. Greene, DA, Arezzo, JC, Brown, MB:
Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. Zenarestat study group.
Neurology 1999, 53 (3), 580-591
 19. Gregersen G., Bertelsen B., Harbo H., Larsen, E., Andersen, JR.:
Oral supplementation of myoinositol: effects on peripheral nerve function in human diabetes and on the concentration in Plasma, erythrocytes, urine and muscle tissue in human Diabetes and normals.
Acta Neurologica Scandinavica 1983, 67, 164 – 172
 20. Gupta, S, Chough, E, Daley, J, Oates, P, Tornheim, K, Ruderman, NB, Keanley, JF:
Hyperglycemia increases endothelial superoxide that impairs smooth muscle cell Na⁺-K⁺-ATPase activity.
Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2002, 282 (3), C560-566

21. Hodgkinson, AD, Bartlett, T, Oates, PJ, Millward, BA, Demaine, AG:
The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic neuropathy.
Diabetes 2003, 52 (3), 846-851
22. Hotta, N, Toyota, T, Matsuoka, K, Shigeta, Y, Kikkawa, R, Kaneko, T, Takahashi, A, Sugimura, K, Koike, Y, Ishii, J, Sakamoto, N:
Clinical efficacy of fiderestat, a novel aldose reductase inhibitor, for diabetic peripheral neuropathy.
Diabetic Care 2001, 24 (10), 1776-1782
23. Inskeep, PB, Ronfeld, RA, Peterson, MJ, Gerber, N:
Pharmacokinetics of the aldose reductase inhibitor, zopolrestat, in humans.
J. Clin. Pharmacol. 1994, 34 (7), 760-766
24. Judzewitsch, RG, Jaspin, JB, Polonsky, KS, Weinberg, CR, Halter, JB, Halar, E, Pfeifer, MA, Vukadinovic, C, Bernstein, L, Schneider, M, Liang, KY, Gabbay, KH, Rubenstein, Ausfallhonorar, VN nicht erschienen, Porte, D :
Aldose reductase inhibition improves nerve conduction velocity in diabetic patients
New England J. Med. 1983, 308, 119 – 125.
25. Kato, K, Nakayama, K, Ohta, M., Murakami, N, Murakami, K., Mizota, M, Miwa, I., Okuda, J. :
Effects of novel Aldose Reductase Inhibitors M 16209 and M 16287 on streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats.
Europ. J. Pharmacol, 1991, 193, 185 – 191.

26. KiharaKihara, M, Mitsui, Y, Shioyama, M, Hasegawa, T, Takahashi, M, Takakura, S, Minoura, K, Kawamura, I:
Effect of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on endoneurinal blood flow in experimental diabetic neuropathy of rat.
Neurosci. Lett. 2001, 310 (2/3), 81-84
27. Masson, EA, Boulton, AJM:
Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic neuropathy. A Review of the rationale and clinical evidence.
Drugs 1990, 39 (2): 190 – 202
28. Macleod, AF, Boulton, AJM, Owens, DR, VanRooy, P, VanGerven, JMA, Macrury, S, Scarpello, JHB, Segers, O, Heller, SR, vanderVeen, EA:
A multicentre trial of the aldose reductase inhibitor tolrestat, in patients with symptomatic diabetic peripheral neuropathy.
Diabet. Metab. 1992, 18, 14-20
29. Obrasova, IG, vanHusen, C, Fathallah, L, Xianghui, C, Green, DA, Stevens, MJ:
An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism and antioxidative defense.
FASEB J. 2002, 16, 123-125
30. Perkins, BA, Bril, V.:
Diabetic neuropathy: a review emphasizing diagnostic methods.
Clin. Neurophysiol. 2003, 114 (7), 1167-1175
31. Poncelet, AN:
Diabetic neuropathy. Risk factors, patterns of presentation diagnosis and treatment.
Geriatrics 2003, 58 (6), 16-8, 24-5, 30

32. Raccach, D, Coste, T, Cameron, NE, Dufayet, D, Vague, P, Hohman, TC:
Effect of the aldose reductase inhibitor tolrestat on nerve conduction velocity, Na/K ATPase activity, and polyols in red blood cells, sciatic nerve, kidney cortex, and kidney medulla of diabetic rats.
J. Diabet. Compl. 1998, 12 (3), 154-162
33. Schmidt, RE, Dorsey, DA, Beaudet, LN, Plurad, SB, Parvin, CA, Yarasheski, KE, Smith, SR, Lang, HJ, Williamson, JR, Ido, Y:
Inhibition of sorbitol dehydrogenase exacerbates autonomic neuropathy in rats with streptozotocin-induced diabetes.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2001, 60 (12), 1153-1169
34. Schneider, RP, Davenport, CJ, Hoffmaster, KA, Inskeep, PB:
Bioavailability, multiple-dose pharmacokinetics and biotransformation of aldose reductase inhibitor zopolrestat in dogs.
Drug Metab. Dispos. 1998, 26 (11), 1160-1166
35. Sima, AAF, Bril, V, Nathaniel, V, McEwen, TAJ, BrownMB, Lattimer, SA and Greene, DA:
Regenerations and repair of myelinated fibers in sural-nerve biopsy specimens from patients with diabetic neuropathy treated with sorbinil.
New England J. Med. 1988, 319, 9, 548 – 555.
36. Sima, AAF, Nathaniel, V, Greene, DA:
Peripheral nerve repair following treatment.
Adv. Exp. Med. Biol. 1991, 291, 265-270
37. Sima, AAF, Greene, DA:
Structural-functional interactions in the therapeutic

- response of diabetic neuropathy.
 Diabetic Medicine 1993, Suppl. 2, 10, 33S-34S
38. Sokal, R.R., Rohlf, F.J.: Biometry. 2. Aufl. Freeman and Company, New York, (1981, 859 S.
39. Spüler, M, Dimpfel, W, Tüllner, HU:
 Effect of Gangliosides on nerve conduction velocity during diabetic neuropathy in the rat.
 Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther. 1987, 287, 211-221
40. Stracke, Meyer, HU, Schumacher, H, Armbrecht, U, Beroniade, S, Buch, KD, Federlin, K, Haupt, E, Husstedt, IW, Kampmann, B, Richter, W, Sönnichsen, A, Zenker, H.:
 Mexiletin in der Behandlung der schmerzhaften diabetischen Neuropathie.
 Medizinische Klinik 1994, 89, 124 – 131
41. Tomlinson, DR, Sidenius, P, Larsen, JR:
 Slow component-a of axonal transport, nerve myoinositol, and aldose reductase inhibition in streptozocin-diabetic rats.
 Diabetes 1986, 35 1986, 398 – 402
42. Tomlinson, DR:
 Aldose reductase inhibitors and the complications of diabetes mellitus.
 Diabetic Medicine 1993, 10, 214-230
43. Tomlinson, DR, Willars, GB, Carrington, AL:
 Aldose reductase inhibitors and diabetic complications.
 Pharmac. Ther. 1992, 151-194
44. Uchida, K, Kigoshi, T, Nakano, S, Ishii, T, Kitazawa, M, Morioto, S:
 Effect of 24 weeks of treatment with epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on peripheral neuropathy in patients

- with non-insulin-dependent diabetes mellitus.
Clin Therapeutics, 1995, 17 (3), 460-466
45. Vinik, AI:
Diabetic neuropathy: Pathogenesis and therapy.
Amer. J. Med. 1999, 107 (2B), 17S-26S
46. Vinik, AI, Park, TS, Stansberry, KB, Pittenger, GL:
Diabetic neuropathies.
Diabetologia 2000, 43, 957-973
47. Wilson, DK, Tarle, I, Petrash, JM, Quiocho, FA:
Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase
complexed with the potent inhibitor zopolrestat.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 1993, 90, 9847-9851
48. Yasuda, H, Terada, M, Maeda, K, Kogawa, S, Sanada, M,
Haneda, M, Kashiwagi, A, Kikkawa, R:
Diabetic neuropathy and nerve regeneration.
Prog. Neurobiol. 2003, 69 (4), 229-285
49. Yoshida, T., Terashima, H.:
Effect of aldose reductase inhibitor ONO 2235 on reduced
sympathetic nervous system activity and peripheral nerve
disorders in STZ-induced diabetic rats.
Diabetes 1987, 36, 6 – 13.
50. Yue, DK, Hanwell, MA, Satchell, PM, Turtle, JR:
The effect of aldose reductase inhibition on motor nerve
conduction velocity in diabetic rats.
Diabetes 1982, 31, 789 – 794

7. Anhang

Auswertung zur Nervenleitgeschwindigkeit: I) Reversibilitätsstudie

Tab. 1: Ergebnis der Varianzanalyse

Faktor	Freiheitsgrade	F-Wert	p-Wert
Hauptfaktoren:			
Therapie	3	19,96	< 0,001
Meßzeitpunkt	1	2,14	0,150
Wechselwirkung			
Therapie* Meßzeitpunkt	3	5,11	0,004
Restvarianz	48		

Tab. 2: Einfluß der Therapie auf die Nervenleitgeschwindigkeit.

Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant

verschieden ($p < 0,05$, Tukey-Test)

Therapie	Mittelwert	Standardabweichung
Basalwert:		
Normalkontrolle I	38,39 c	,94
Diabetische Kontrolle I	35,56 ab	1,73
Insulintherapie I	34,36 a	2,27
Reversibilitätsgruppe	38,59 c	1,07
Nach 24 Wochen:		
Normalkontrolle I	38,98 c	,70
Diabetische Kontrolle I	36,06 ab	1,54
Insulintherapie I	37,47 bc	,66
Reversibilitätsgruppe	37,61 bc	,43

Anmerkungen:

- Zur Interpretation: Vor Versuchsbeginn lag der Nervenleitgeschwindigkeit in der Normal- und in der Reversibilitätsgruppe signifikant höher als in den beiden Gruppen Diabetische Kontrolle und Insulintherapie. Bis zum Versuchsende

nach 24 Wochen fiel die Nervenleitgeschwindigkeit in der Reversibilitätsgruppe leicht ab, in den anderen drei Gruppen zeigt sich ein Anstieg. Dieser Anstieg ist in der Gruppe mit Insulintherapie signifikant.

Zu Versuchsende liegen signifikante Unterschiede nur noch zwischen den beiden Gruppen Normalkontrolle und Diabetische Kontrolle vor. Die Nervenleitgeschwindigkeit in der Gruppe mit Insulintherapie und in der Reversibilitätsgruppe ist nicht signifikant niedriger als in der Normalkontrolle.

a) Test der Voraussetzungen für eine Varianzanalyse: Test auf Normalverteilung

- - - - - Kolmogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

ID_GRUPP: 1 Normalkontrolle I, Basiswert

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,1172	7	> ,2000

ID_GRUPP: 2 Diabetische Kontrolle I, Basiswert

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,2009	7	> ,2000

ID_GRUPP: 3 Insulintherapie I, Basiswert

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,2494	7	> ,2000

ID_GRUPP: 4 Reversibilitätsgruppe, Basiswert

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,2213	7	> ,2000

ID_GRUPP: 9 Normalkontrolle I, nach 24 Wochen

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,2372	7	> ,2000

ID_GRUPP: 10 Diabetische Kontrolle I, nach 24 Wochen

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,2561	7	,1827

ID_GRUPP: 11 Insulintherapie I, nach 24 Wochen

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,2563	7	,1822

ID_GRUPP: 12 Reversibilitätsgruppe, nach 24 Wochen

Valid cases: 7,0 Missing cases: ,0
 Statistic df Significance
 K-S (Lilliefors) ,1600 7 > ,2000

b) Test der Voraussetzungen für eine Varianzanalyse: Test auf Homogenität der Varianzen

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
1,2600	7	48	,290

c) Multifaktorielle Varianzanalyse: Faktoren Therapie und Messzeitpunkt

* * * A N A L Y S I S O F V A R I A N C E * * *

SQ10NERV nervleit ** 10 by THERAPIE
 MESSUNG Zeitpunkt der Messung

UNIQUE sums of squares
 All effects entered simultaneously

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Sig of F
Main Effects	1,56449E+32	4	3,911226E+31	15,507	,000
THERAPIE	1,51063E+32	3	5,035422E+31	19,964	,000
MESSUNG	5,38636E+30	1	5,386362E+30	2,136	,150
2-Way Interactions	3,86556E+31	3	1,288520E+31	5,109	,004
THERAPIE MESSUNG	3,86556E+31	3	1,288520E+31	5,109	,004
Explained	1,95105E+32	7	2,787209E+31	11,051	,000
Residual	1,21066E+32	48	2,522201E+30		
Total	3,16170E+32	55	5,748551E+30		

56 cases were processed.

0 cases (,0 pct) were missing.

d) Multipler Test auf paarweise Unterschiede (Tukey-Verfahren)

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable SQ10NERV nervleit ** 10
By Variable ID_GRUPP

Multiple Range Tests: Tukey-HSD test with significance level ,050

The difference between two means is significant if

$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq 1,12299\text{E}+15 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/\text{N}(I) + 1/\text{N}(J))$
with the following value(s) for RANGE: 4,48

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G G G G G
r r r r r r r r
p p p p p p p p
1 1 1
3 2 0 1 2 1 4 9

Mean	ID_GRUPP		
2,7374E+15	Grp 3		a
3,5270E+15	Grp 2		ab
3,9889E+15	Grp10		ab
5,5228E+15	Grp11	*	bc
5,6906E+15	Grp12	*	bc
7,1104E+15	Grp 1	* * *	c
7,5431E+15	Grp 4	* * *	c
8,1966E+15	Grp 9	* * *	c

e) Berechnung der Mittelwerte und weiterer Kennzahlen, die in Tabellen oder Abb. dargestellt werden sollen

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	7	38,3900	,9415	,3558	36,77	39,59
Grp 2	7	35,5571	1,7267	,6526	33,41	37,60
Grp 3	7	34,3643	2,2718	,8587	31,63	38,33
Grp 4	7	38,5886	1,0747	,4062	37,25	39,90
Grp 9	7	38,9814	,7031	,2657	37,48	39,45
Grp10	7	36,0557	1,5417	,5827	34,33	38,62
Grp11	7	37,4686	,6649	,2513	36,73	38,75
Grp12	7	37,6100	,4289	,1621	36,84	38,02
Total	56	37,1270	1,9700	,2632	31,63	39,90

Auswertung zur Nervenleitgeschwindigkeit: II) Inhibitionsstudie

Tab. 1: Ergebnis der Varianzanalyse

Faktor	Freiheitsgrade	F-Wert	p-Wert
Hauptfaktoren:			
Therapie	3	26,35	< 0,001
Meßzeitpunkt	1	3,64	0,062
Wechselwirkung			
Therapie* Meßzeitpunkt	3	6,60	0,001
Restvarianz	50		

Tab. 2: Einfluß der Therapie auf die Nervenleitgeschwindigkeit.

Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant

verschieden ($p < 0,05$, Tukey-Test)

Therapie	Mittelwert	Standardabweichung
Basalwert:		
Normalkontrolle II	38,12 b	,94
Diabetische Kontrolle II	37,08 ab	1,45
Insulintherapie II	36,27 ab	1,61
Inhibitionsgruppe	33,98 a	2,75
Nach 12 Wochen:		
Normalkontrolle II	39,95 c	,65
Diabetische Kontrolle II	35,81 a	1,59
Insulintherapie II	36,21 ab	1,44
Inhibitionsgruppe	36,13 ab	1,08

Anmerkungen:

- Zur Interpretation: Vor Versuchsbeginn lag der Nervenleitgeschwindigkeit in der Normalgruppe signifikant höher als in der Reversibilitätsgruppe. Bis zum Versuchsende nach 12 Wochen fiel die Nervenleitgeschwindigkeit in den Gruppen Diabetische Kontrolle und Insulintherapie leicht ab, in den anderen beiden Gruppen zeigt sich ein Anstieg. Dieser Anstieg ist in der

Normalkontrolle signifikant.

Zu Versuchsende liegt die Nervenleitgeschwindigkeit in der Normalgruppe signifikant höher als in den drei Behandlungsgruppen. Diese unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, insbesondere ist die Nervenleitgeschwindigkeit in der Reversibilitätsgruppe nicht signifikant höher als in den Gruppen Diabetische Kontrolle und Insulintherapie.

a) Test der Voraussetzungen für eine Varianzanalyse: Test auf Normalverteilung

- - - - - Kolmogorov - Smirnov Goodness of Fit Test

ID_GRUPP: 5 Normalkontrolle II, Basiswert

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,1139	7	> ,2000

ID_GRUPP: 6 Diabetische Kontrolle II, Basiswert

Valid cases:	8,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,3104	8	,0224

ID_GRUPP: 7 Insulintherapie II, Basiswert

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,1397	7	> ,2000

ID_GRUPP: 8 Inhibitionsgruppe, Basiswert

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,3272	7	,0225

ID_GRUPP: 13 Normalkontrolle II, nach 12 Wochen

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,1342	7	> ,2000

ID_GRUPP: 14 Diabetische Kontrolle II, nach 12 Wochen

Valid cases:	8,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,1492	8	> ,2000

ID_GRUPP: 15 Insulintherapie II, nach 12 Wochen

Valid cases:	7,0	Missing cases:	,0
	Statistic	df	Significance
K-S (Lilliefors)	,1555	7	> ,2000

ID_GRUPP: 16 Inhibitionsgruppe, nach 12 Wochen

Valid cases: 7,0 Missing cases: ,0
 Statistic df Significance
 K-S (Lilliefors) ,1508 7 > ,2000

b) Test der Voraussetzungen für eine Varianzanalyse: Test auf Homogenität der Varianzen

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
1,3643	7	50	,241

c) Multifaktorielle Varianzanalyse: Faktoren Therapie und Messzeitpunkt

* * * A N A L Y S I S O F V A R I A N C E * * *

SQ10NERV nervleit ** 10 by THERAPIE
 MESSUNG Zeitpunkt der Messung

UNIQUE sums of squares
 All effects entered simultaneously

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Sig of F
Main Effects	2,40293E+32	4	6,007323E+31	20,673	,000
THERAPIE	2,29730E+32	3	7,657669E+31	26,353	,000
MESSUNG	1,05629E+31	1	1,056286E+31	3,635	,062
2-Way Interactions	5,75729E+31	3	1,919096E+31	6,604	,001
THERAPIE MESSUNG	5,75729E+31	3	1,919096E+31	6,604	,001
Explained	2,95954E+32	7	4,227909E+31	14,550	,000
Residual	1,45292E+32	50	2,905842E+30		
Total	4,41246E+32	57	7,741154E+30		

58 cases were processed.

0 cases (,0 pct) were missing.

d) Multipler Test auf paarweise Unterschiede (Tukey-Verfahren)

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable SQ10NERV nervleit ** 10
By Variable ID_GRUPP

Multiple Range Tests: Tukey-HSD test with significance level ,050

The difference between two means is significant if $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 1,20537E+15 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
with the following value(s) for RANGE: 4,47

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

		G G G G G G G G	
		r r r r r r r r	
		p p p p p p p p	
		1 1 1 1	
		8 4 6 5 7 6 5 3	
Mean	ID_GRUPP		
2,6845E+15	Grp 8		a
3,6971E+15	Grp14		a
3,9223E+15	Grp16		ab
4,1024E+15	Grp15		ab
4,2122E+15	Grp 7		ab
5,2356E+15	Grp 6		ab
6,6249E+15	Grp 5	* *	b
1,0455E+16	Grp13	* * * * * *	c

e) Berechnung der Mittelwerte und weiterer Kennzahlen, die in Tabellen oder Abb. dargestellt werden sollen

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 5	7	38,1200	,9443	,3569	36,33	39,13
Grp 6	8	37,0825	1,4474	,5117	35,69	39,64
Grp 7	7	36,2686	1,6113	,6090	33,12	37,89
Grp 8	7	33,9800	2,7450	1,0375	31,42	38,55
Grp13	7	39,9486	,6503	,2458	38,85	40,63
Grp14	8	35,8113	1,5932	,5633	32,14	37,10
Grp15	7	36,2057	1,4388	,5438	34,22	38,01
Grp16	7	36,1329	1,0787	,4077	34,50	37,38
Total	58	36,6852	2,1886	,2874	31,42	40,63

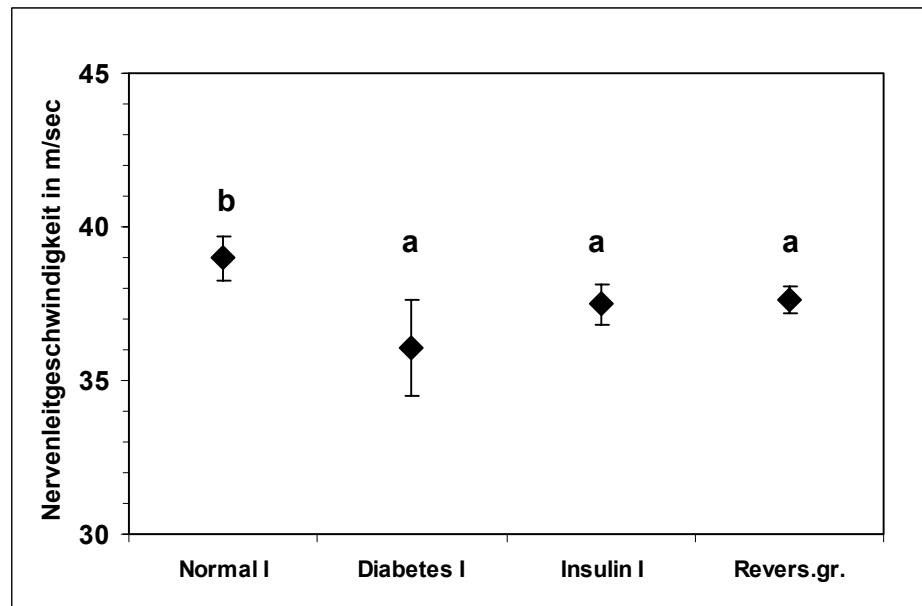


Abb. 1: Einfluß der Therapie auf die Nervenleitgeschwindigkeit in der Reversibilitätsstudie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$, Tukey-Test)

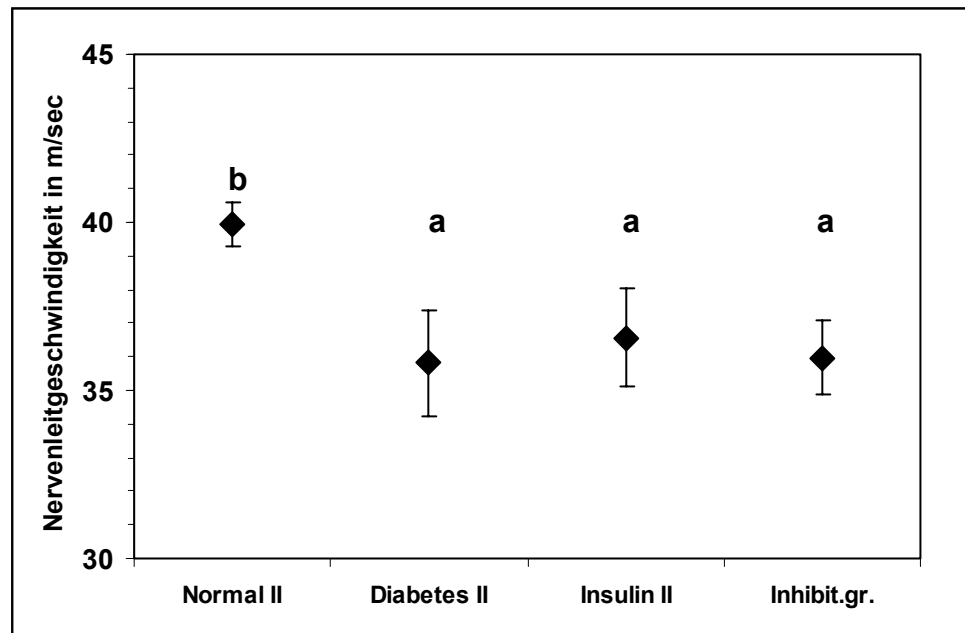


Abb. 2: Einfluß der Therapie auf die Nervenleitgeschwindigkeit in der Inhibitionsstudie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$, Tukey-Test)

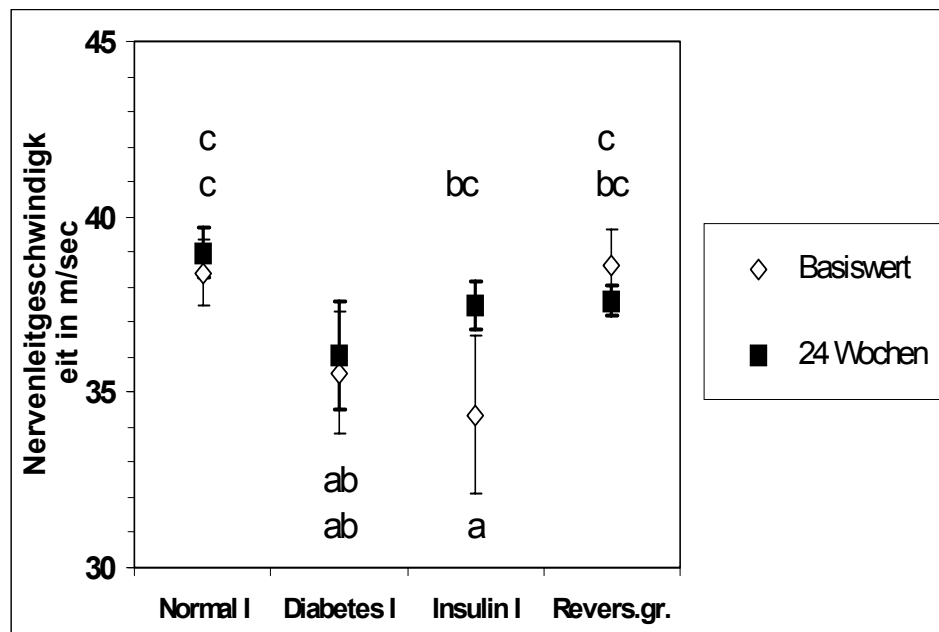


Abb. 3: Einfluß der Therapie auf die Nervenleitgeschwindigkeit in der Reversibilitätsstudie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung zu Beginn der Studie und zum Ende der Studie nach 24 Wochen. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$, Tukey-Test).

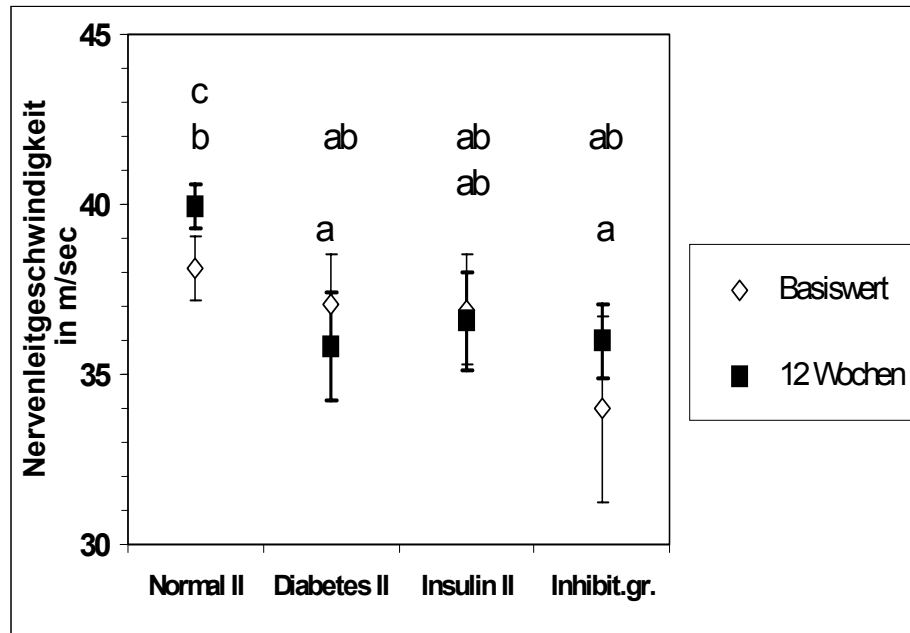


Abb. 4: Einfluß der Therapie auf die Nervenleitgeschwindigkeit in der Inhibitionsstudie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung zu Beginn der Studie und zum Ende der Studie nach 12 Wochen. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$, Tukey-Test)

ZUSAMMENFASSUNG

Über die Pathophysiologie, der durch Diabetes mellitus bedingten Komplikationen herrscht immer noch weitgehend Unklarheit. Es gibt allerdings Hinweise, dass der Polyol-Stoffwechsel mit den daraus entstehenden Metaboliten Sorbitol und Fructose, einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der Polyneuropathie hatten. Das entscheidende Enzym in diesem Polyol-Stoffwechsel ist die Aldose-Reduktase, welche in fast allen Geweben, in denen Langzeitkomplikationen des Diabetes eine Rolle spielen, vorkommt. So liegt es nahe dieses Enzym gezielt zu hemmen, um eine deutliche Verringerung, der die Gewebe schädigenden Stoffe zu erreichen. Die Substanz CP 73,880 ist ein Nicht-Kompetetiver Hemmer des Aldose-Reduktase. In vorab stattfindenden Experimenten hat sich gezeigt, das CP 73,880 die Akkumulation des hauptsächlich die Nerven schädigenden Substanz, Sorbitol, hemmen kann.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Effektivität einer Therapie mit CP73,880 am Beispiel der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit im Nervus ischiadicus, der durch Streptozotocin diabetisch gemachten Ratten, zu zeigen. Zu diesem Zweck wurden mehrere Tiergruppen gebildet, um die Auswirkungen der Therapie sowohl über eine kurze, als auch über einen langen Zeitraum, sowie auch mit verschiedenen zusätzlichen Therapieformen zu prüfen.

Es ist deutlich zu erkennen, das es Unterschiede in den Basalwerten der durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeit von Versuchsbeginn an gibt. Dies macht die Vergleichbarkeit der Daten schwierig. Interessanterweise starben weniger Tiere

nach Streptozotocin-Injektion in der Gruppe, die mit CP 73,880 behandelt wurden, im Vergleich zu den Tieren, die mit Insulin behandelt wurden oder ohne jede Therapie blieben. Auch erschien die Steigerung der durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeiten der Gruppe, die nach einem therapeutischen Intervall mit CP 73,880 behandelt worden waren, Hinweise zu geben auf die Wirksamkeit des Medikamentes.

Unterschiede in den Basisausgangswerten sowie die hohe Sterblichkeit der Tiere machen es schwierig, diese Beobachtung statistisch einwandfrei zu belegen.

Eventuell spielt es auch eine nicht zu unterschätzende Rolle, dass speziell die Tiere, die überlebt haben, auch eine hohe Resistenz gegenüber der Schädigung von Sorbitol gezeigt haben.

An den Grundgedanken dieser Studie ändert dies jedoch nichts. Es bleibt ein auf jeden Fall weiter zu verfolgender Ansatz, die Wirkung von neuen Medikamenten, die den Polyol-Stoffwechsel betreffen, auf diese Art nachzuweisen.

SUMMARY

There are still great deal of open questions about the pathophysiologi of the complications caused by diabetes mellitus. There is, however, basis for the assumption that polyol metabolism, which forms the metabolites, sorbitol and fructose, has a decisive influence on the development of polyneuropathi. The decive enzyme of the polyol path way ist aldose-reductase, found in almost all tissue in which long term diabetes complications play a role. Therefore it seems justified to focus attention on this enzym in order to achieve marked reduction of the substance detrimental to the tissue.

The substance CP 73,880 is a non-competative suppressor of aldose-reductase. Pre-experimental tests have shown that CP 73,880 can stop the accumulation of the substance, sorbitol, which above all damage the nerves.

The aim of this study is to show the effectiveness of a therapy with CP 73,880 exemplified by measuring the nerv conduction velocity in the nervus ischiadicus of rats made diabetic by injecting in them with streptozotocin. For the purpose several groups of animals were formed in order to test the effects of the therapy over a short and long period as well as with various additional forms of therapy.

It is quite clear that there are difference in the base counts from the beginning of the experiments which makes it difficult to compare data. Interestingly enough, fewer rats in the group which was treatet with CP 73,880 died after being injected with streptozotocin compared to the rats which were treated with insulin or those that had no therapy.

Also it seems that the increase of the average conduction velocity in the group which was treated with CP 73,880 after an interval without any therapy gives a sign of the power of the new medication.

It is difficult to support these observations by statistical evidence proved beyond doubt on account of the varying basic starting counts and the high mortality of the rats.

Another point which should be taken into consideration is that especially the animals which survived showed a strong resistance to the damage done by sorbitol.

However it does not change the basic principle of the study. This attempt at proving the effects of new medication affecting polyol metabolism is at all events worth following up.

8. LEBENS LAUF

Persönliche Daten	Karsten Riege, geb. 24.11.1960 verheiratet mit: Silvia Riege, Diplom-Betriebswirtin Kinder: Christian Riege, 13 Jahre Fabian Riege, 7 Jahre
Schulbildung	1966 – 1970 Burggrundschule in Neuenrade 1970 – 1979 Walram – Gymnasium in Mende
Wehrdienst	1979 – 1980 Wehrdienst bei dem Fallschirmbatallion 271 in Iserlohn
Studium	SS 1981 Studium der Biologie und Chemie an PH in Dortmund WS 1981/82 – WS 1983/84 Studium der Diplom-Biologie an der Universität in Kiel SS 1984 – WS 1984/85 Studium der Humanbiologie an der Universität in Marburg SS 1985 – SS 1989 Studium der Humanmedizin an der Universität in Gießen WS 1989/90 – SS 1990 Praktisches Jahr in den Fachrichtungen Chirurgie, Innere Medizin und Anästhesie am Universitätslehrkranken- Haus in Lich
Famulaturen	21.02.1987 – 21.03.1987 im Ev. Krankenhaus in Plettenberg 16.02.1988 – 16.03.1988 im St.-Franziskus-Krankenhaus , Aachen 01.08.1988 – 31.08.1988 im Mater-Private-Hospital in Townsville, Australien

	21.02.1989 – 21.03.1989 in der Praxis des niedergelassenen Internisten Dr. med. Hans-Dieter Riege in Werdohl
Berufspraxis	1990 – 1992 AIP-Tätigkeit am KKH, Lüdenscheid mit dem Schwerpunkt Innere Medizin und Nephrologie 1992 – 1996 Assistenzarzt-Tätigkeit am KKH, Lüdenscheid in den Abteilungen Innere Medizin II + III mit dem Schwer- punkten Pulmonologie + Kardiologie 1996 – 1997 Tätigkeit als Praxisassistent in der Praxis des Facharztes für Innere Medizin Dr. med. H.-D. Riege, Werdohl 1998 – 2002 Kassenarzt-Tätigkeit als hausärztlich Tätiger Internist in eigener Praxis in Werdohl mit LVA-Gutachertätigkeit Tätigkeit als Betriebsarzt in Verschiedenen kleineren und mittel- großen Betrieben der metall- verarbeitenden Industrie sowie in mehreren Kranken-Gymnastikpraxen Ehrenamtlicher Notarzt beim DRK als Ausbilder und Einsatzarzt 2002 – fortlaufend Bildung einer Gemeinschaftspraxis mit einem Kollegen der Facharzt für Allgemeinmedizin ist

Neuenrade, im Juli 2004

Karsten Riege

9. DANKSAGUNG

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. med. Hilmar Stracke für die langjährige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und meinen Eltern, die mir ermöglichten, dass ich diesen Weg ungestört gehen konnte.

Weiterhin danke ich meinen Kindern und meiner Frau, dass sie mir auch in schwierigen Zeiten beigestanden haben.

Karsten Riege

10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Karsten Riege